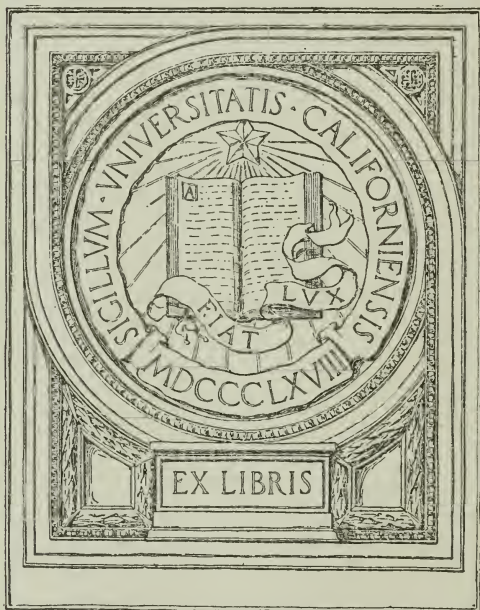




MEDICAL SCHOOL  
LIBRARY



EX LIBRIS

Hooper Foundation  
Accession



Loaned  
by

W. Whitney

54



# Analyse des Harns.

Zum Gebrauch für

Mediziner, Chemiker und Pharmazeuten

zugleich

Elfte Auflage von Neubauer-Huppert's Lehrbuch.

Bearbeitet von

**A. Ellinger-Königsberg, H. Eppinger-Wien, † F. Falk-Wien, F. N. Schulz-Jena,  
K. Spiro-Strassburg und W. Wiechowski-Wien.**



Digitized by the Internet Archive  
in 2012

<http://archive.org/details/analysedesharns01wies>

# Analyse des Harns.

Zum Gebrauch für

Mediziner, Chemiker und Pharmazeuten

zugleich

Elfte Auflage von Neubauer-Huppert's Lehrbuch.

Bearbeitet von

A. Ellinger-Königsberg, H. Eppinger-Wien, † F. Falk-Wien, F. N.  
Schulz-Jena, K. Spiro-Strassburg i. E. und W. Wiechowski-Wien.

∞ ∞ ∞ Zweite Hälfte. ∞ ∞ ∞

Mit Textabbildungen, 6 lithographischen Tafeln und einer Logarithmentafel.



Wiesbaden.

C. W. Kreidels Verlag.

1913.

UNIV OF CALIF  
MEDICAL LIBRARY  
SANTA BARBARA, CALIF.



---

Nachdruck verboten.

Das Recht der Übersetzung in allen Sprachen vorbehalten.  
Copyright 1913 by C. W. Kreidels Verlag.

---

---

Druck der Königl. Universitätsdruckerei H. Stürtz A. G., Würzburg.

ULAS TO VIBU  
JOONER JACIEN

RB 53

N 47

v. 2 pt 1

1913

## Vorwort.

---

Indem wir die zweite Hälfte gemeinsamer Arbeit hinausgehen lassen, gedenken wir mit Wehmut und Trauer unseres gemeinsamen Freundes und Mitarbeiters,

**Dr. Fritz Falk.**

Was die Wissenschaft an ihm verloren hat, wird auch sein folgender Beitrag zeigen: Vielseitiges Wissen und umfassende Belesenheit, gediegenes Können und kritisches Urteil. Es ist doppelt tragisch, dass gerade der jüngste von uns die Vollendung des gemeinsamen Werkes nicht erleben durfte, dessen Anfänge er mit freudigem Enthusiasmus zu fördern suchte. Treue Freundeshand hat im Sinne des Verstorbenen diese seine letzte Arbeit zu Ende geführt.

Wenn aus diesen und anderen Gründen die zweite Hälfte so spät nach der ersten erscheinen musste, so hat sich dies jeder von uns zunutze gemacht, und man wird finden, dass wir nicht nur Literatur zusammengetragen haben, sondern aus eigenem zu geben suchten und dass auch der vorliegende Teil neben der abwägenden und auswählenden Kritik eine Fülle neuer unveröffentlichter Beobachtungen enthält, wie es der Tradition dieses Buches entspricht.

So hoffen wir, dass auch der Schluss des Werkes des einmütigen und anspornenden Lobes nicht unwürdig sein möge, den der erste Teil geerntet hat und für den auch an dieser Stelle zu danken uns Bedürfnis ist.

Januar 1913.

**Ellinger, Eppinger, Henderson, Schulz,  
Spiro, Wiechowski.**



# Inhaltsverzeichnis.

	Seite
<b>Stickstoffhaltige Verbindungen. (Fortsetzung) von A. Ellinger-</b>	
Königsberg i. Pr. . . . .	683
<b>Diamine. Von A. Ellinger-Königsberg i. Pr. . . . .</b>	683
Vorkommen . . . . .	683
I. Putrescin . . . . .	685
II. Cadaverin . . . . .	688
Darstellung und Nachweis . . . . .	691
<b>Basen bekannter Konstitution, die im normalen Harn in geringen</b>	
<b>    Mengen vorkommen . . . . .</b>	694
I. Methylguanidin . . . . .	694
Vorkommen . . . . .	694
Eigenschaften . . . . .	695
Darstellung und Nachweis . . . . .	698
II. Dimethylguanidin . . . . .	700
Vorkommen, Eigenschaften . . . . .	700
Darstellung . . . . .	701
III. Pyridylmethyllumoniumhydroxyd . . . . .	702
Vorkommen . . . . .	702
Eigenschaften . . . . .	703
Darstellung . . . . .	704
IV. 4-Methylpyridin . . . . .	705
Vorkommen . . . . .	705
Eigenschaften, Darstellung . . . . .	706
<b>Aus normalem Harn isolierte Basen von unbekannter Konstitution . . . . .</b>	707
I. Substanz von Baumstark . . . . .	707
II. Substanz von Meissner . . . . .	708
III. Verbindung von Pouchet . . . . .	708
IV. Die Base $C_7H_{15}NO_2$ (bzw. $C_7H_{17}NO_2$ ) Dombrowski, Kutscher und	
Lohmann . . . . .	709
Anhang. Die Abspaltung von Trimethylamin aus Harn . . . . .	712
1. Nachweis von Trimethylamin nach Takeda . . . . .	713
2. Bestimmung des mit Alkalien aus dem Harn abspaltbaren	
Trimethylamins nach de Filippi . . . . .	714
V. Gynasin . . . . .	716
VI. Mingin . . . . .	717
VII. Kynosin . . . . .	717
VIII. Protaminähnliche Verbindung von Engeland . . . . .	718
<b>Basen aus dem Harn mit Phosphor vergifteter Hunde . . . . .</b>	718
I. $\gamma$ -n-Butyrobetain . . . . .	718
Vorkommen, Eigenschaften . . . . .	719
Darstellung . . . . .	720
II. Die Base $C_{13}H_{26}N_2O_3$ (Takeda) . . . . .	721
III. Die Base $C_{13}H_{26}N_2O_5$ (Takeda) . . . . .	721

	Seite
<b>Sonstige Versuche zum Nachweis und zur Isolierung giftiger Bestandteile aus normalen und pathologischen Harnen (Ptomaine)</b>	722
Vorkommen . . . . .	722
Beschreibung einzelner Darstellungsversuche . . . . .	729
a) Substanzen kolloidalen Charakters . . . . .	729
b) Substanzen von Alkaloid-Charakter . . . . .	734
Darstellung und Nachweis . . . . .	743
<b>Schwefelhaltige Verbindungen der aliphatischen Reihe.</b>	Von
<b>A. Ellinger-Königsberg i. Pr.</b> . . . . .	746
<b>I. Rhodanwasserstoff</b> . . . . .	746
Vorkommen . . . . .	746
Eigenschaften . . . . .	748
Nachweis und Isolierung . . . . .	751
Bestimmung des Rhodans . . . . .	753
a) Als Silberverbindung, b) Kolorimetrisch . . . . .	753
c) Jodometrisch . . . . .	754
<b>II. Methylmercaptan</b> . . . . .	756
Vorkommen . . . . .	756
Eigenschaften . . . . .	757
Nachweis . . . . .	758
<b>III. Äthylsulfid</b> . . . . .	759
Vorkommen . . . . .	759
Eigenschaften . . . . .	760
Darstellung, Nachweis . . . . .	762
<b>IV. Diäthylmethylsulfoniumbase</b> . . . . .	763
<b>Aromatische Verbindungen.</b>	Von A. Ellinger-Königsberg i. Pr. . . . . 764
<b>Phenole</b> . . . . .	764
<b>I. Phenol</b> . . . . .	765
Vorkommen . . . . .	765
Eigenschaften . . . . .	767
Nachweis, Bestimmung . . . . .	773
Anhang . . . . .	774
1. Phenolschwefelsäure . . . . .	774
2. Phenolglycuronsäure . . . . .	775
Vorkommen, Eigenschaften, Darstellung . . . . .	776
Nachweis . . . . .	777
<b>II. Kresol</b> . . . . .	777
Vorkommen . . . . .	777
Eigenschaften . . . . .	778
Nachweis . . . . .	780
Darstellung . . . . .	781
Anhang . . . . .	781
1. p-Kresolschwefelsäure . . . . .	781
2. p-Kresolglycuronsäure . . . . .	782
3. Urogon (Mooser) . . . . .	783
Bestimmung des Phenols und Kresols . . . . .	784
1. Gemeinsame Bestimmung des Phenols und p-Kresols . . . . .	784
a) Methode von Messinger und Vortmann . . . . .	784
b) Modifikation von Neuberg . . . . .	785
c) Modifikation von Mooser . . . . .	786
d) Ausschüttelungs-Verfahren von Ellinger-Hensel . . . . .	788
2. Getrennte Bestimmung von Phenol und p-Kresol . . . . .	788
a) Destillation der Phenole in Dampfstrom . . . . .	791
b) Titration der Phenole . . . . .	792
I. Bestimmung von b <sub>1</sub> . . . . .	792
II. Bestimmung von b <sub>2</sub> . . . . .	792



	Seite
3. Kolorimetrische bzw. spektrophotometrische Bestimmungen des Phenols . . . . .	793
III. Brenzkatechin . . . . .	793
Vorkommen . . . . .	793
Eigenschaften . . . . .	795
Nachweis . . . . .	795
IV. Hydrochinon . . . . .	796
Vorkommen, Eigenschaften . . . . .	796
Nachweis . . . . .	797
V. Indoxyl . . . . .	797
Vorkommen . . . . .	798
Eigenschaften . . . . .	801
Darstellung . . . . .	804
Nachweis . . . . .	805
Bestimmungsmethoden . . . . .	807
1. Titrimetrische Bestimmung des Indigoblaus . . . . .	808
Modifikation von Imabuchi . . . . .	810
2. Wägung des Indigoblaus . . . . .	810
3. Kolorimetrische Bestimmung des Indigoblaus . . . . .	810
4. Spektrophotometrische Bestimmung des Indigoblaus nach F. Müller . . . . .	811
5. Titration des Indigrots (Bouma) . . . . .	811
6. Kolorimetrische Bestimmung des Indigrots . . . . .	812
7. Kolorimetrische Bestimmung nach Montfret . . . . .	813
Umwandlungsprodukte des Skatols . . . . .	814
<b>Säuren</b> . . . . .	815
Benzoessäure . . . . .	815
Vorkommen, Eigenschaften . . . . .	815
Nachweis und Darstellung . . . . .	816
Bestimmung . . . . .	817
Hippursäure . . . . .	817
Vorkommen . . . . .	817
Eigenschaften . . . . .	818
Darstellung . . . . .	821
Nachweis . . . . .	824
Bestimmungsmethoden . . . . .	825
I. Darstellung und Wägung der Hippursäure . . . . .	825
1. Verfahren von Bunge und Schmiedeberg . . . . .	825
2. Modifikation von Rem-Picci . . . . .	826
3. Methode von Dakin . . . . .	826
II. Bestimmung des Hippursäure-Stickstoffs . . . . .	828
III. Bestimmung der Hippursäure durch Formoltitration . . . . .	828
IV. Methoden, nach welchen die freie und gebundene Benzoessäure bestimmt wird . . . . .	828
1. Methode von Jaarsveld und Stockvis . . . . .	828
2. Methoden, bei welchen die aus Hippursäure abgespaltene Benzoessäure mit Wasserdampf abdestilliert wird . . . . .	830
a) Methode von Pfeiffer, Bloch und Riecke . . . . .	830
b) Methode von Wiechowski . . . . .	833
c) Methode von Seo . . . . .	836
3. Bestimmung der Gesamt-Benzoessäure nach Folin und Flanders . . . . .	836
V. Bestimmung der Benzoessäure, Hippursäure und Phenacetursäure nach Steenbock . . . . .	838
Phenacetursäure . . . . .	838
Vorkommen, Eigenschaften . . . . .	838
Darstellung, Nachweis, Bestimmung . . . . .	840

	Seite
Aromatische Oxysäuren . . . . .	842
I. Die Oxysäuren des normalen Harns . . . . .	842
1. Paraoxyphenyllessigsäure . . . . .	842
Vorkommen . . . . .	842
Darstellung . . . . .	843
Nachweis . . . . .	844
2. Paraoxyphenylpropionsäure . . . . .	845
Eigenschaften . . . . .	845
Darstellung, Nachweis . . . . .	846
3. Paraoxybenzoesäure . . . . .	846
Vorkommen, Eigenschaften . . . . .	846
II. p-Oxyphenylmilchsäure . . . . .	847
Vorkommen, Eigenschaften . . . . .	847
Darstellung . . . . .	848
III. Gallussäure . . . . .	849
Vorkommen, Eigenschaften, Darstellung, Bestimmung . . . . .	849
IV. Homogentisinsäure (Alkaptonurie) . . . . .	850
Vorkommen . . . . .	851
Eigenschaften . . . . .	854
Darstellung . . . . .	858
Nachweis . . . . .	860
Bestimmung . . . . .	861
Anhang: Bestimmung der Gallussäure . . . . .	862
Heterocyclische Säuren . . . . .	862
I. Indolessigsäure . . . . .	862
Vorkommen . . . . .	863
Eigenschaften . . . . .	864
Nachweis . . . . .	866
II. Unbekannte Substanzen, die bei der Destillation des Harns Indol abspalten . . . . .	866
III. Kynurensäure . . . . .	868
Vorkommen . . . . .	868
Eigenschaften . . . . .	870
Darstellung . . . . .	873
Nachweis . . . . .	876
Bestimmung . . . . .	877
Lithursäure . . . . .	877
Vorkommen . . . . .	877
Eigenschaften . . . . .	878
Farbstoffe, die den Indolkern enthalten . . . . .	878
I. Indigblau . . . . .	878
Vorkommen . . . . .	878
Eigenschaften . . . . .	879
Nachweis . . . . .	880
II. Rote Farbstoffe . . . . .	881
Indigorot . . . . .	881
Vorkommen . . . . .	881
Eigenschaften . . . . .	882
Darstellung . . . . .	884
Nachweis . . . . .	885
Urorosein . . . . .	886
Vorkommen . . . . .	887
Eigenschaften . . . . .	888
Darstellung . . . . .	889
Nachweis . . . . .	890
Skatolrot . . . . .	891

	Seite
<b>Farbstoffe unbekannter Abstammung</b>	892
Uroerythrin	892
Vorkommen	892
Eigenschaften	893
Darstellung	897
Nachweis	898
Urohämatin von Harley	899
Giacosas Farbstoff	899
Der Harnsäurefarbstoff von Kunkel	900
Der von Leube beobachtete Farbstoff	900
Der von Thormählen beobachtete Farbstoff	901
Der von Schölberg beobachtete Farbstoff	901
Nephrorosein	902
Anhang. Farbstoffe, die bei Gegenwart von Formaldehyd auftreten	902
<b>Die Purinstoffe und das Allantoin.</b> Von W. Wiechowski-Prag	904
<b>A. Allgemeine Übersicht</b>	906
1. Die endogene Purinausscheidung	909
2. Die exogene Ausscheidung	916
3. Die Verteilung der Purinstoffe im Harn und ihr Schicksal im Organismus	925
Allgemeine Eigenschaften	931
Bestimmung des Gesamt-Purin-Stickstoffs	940
1. Fällung als Silberoxydylverbindungen. Verfahren nach Camerer-Arnstein	941
2. Fällung als Kupferoxydulverbindungen nach Krüger und Schmid	946
<b>B. Die Purinbasen</b>	948
I. Die einzelnen Purinbasen	948
1. Adenin	948
Vorkommen	948
Eigenschaften	949
Darstellung, Nachweis	954
2. Guanin	954
Vorkommen, Eigenschaften	955
Darstellung	959
3. Epiguanin	959
Vorkommen	960
Synthese, Eigenschaften, Nachweis	960
4. Hypoxanthin	961
Vorkommen, Bildung	961
Eigenschaften	962
Darstellung	964
Nachweis	965
5. Episarkin	965
6. Xanthin	965
Vorkommen	965
Bildung, Eigenschaften	966
Darstellung, Nachweis	969
7. 1-Methylxanthin	970
Vorkommen, Eigenschaften	971
Nachweis	971
8. 3-Methylxanthin	971
Vorkommen, Eigenschaften	971
9. Heteroxanthin	972
Vorkommen, Synthese	972
Eigenschaften	973
Nachweis, Darstellung	974

	Seite
10. Paraxanthin . . . . .	975
Vorkommen, Synthese, Eigenschaften . . . . .	975
Darstellung, Nachweis . . . . .	976
II. Quantitative Bestimmung der Purinbasen . . . . .	976
Direkte Verfahren . . . . .	979
1. Durch Fällung als Silbersalz . . . . .	979
a) Nach Salkowski . . . . .	979
b) Im Anschluss an die Harnsäurebestimmung nach Ludwig . . . . .	981
c) Nach Kennaway . . . . .	982
d) Nach Niemilowicz . . . . .	982
2. Durch Fälln als Kupferoxydulsalz nach Krüger und Schmid . . . . .	983
3. Durch Fälln mit Phosphorwolframsäure . . . . .	984
4. Durch Titrieren mit Silbersalz . . . . .	984
Indirekte Verfahren . . . . .	985
1. Nach Haycraft . . . . .	985
2. Nach Camerer . . . . .	987
III. Darstellung, Trennung und Identifizierung der Purinbasen . . . . .	988
1. Trennung der Basen in Verbindung mit salpetersaurem Silber . . . . .	989
a) Verarbeitung der Lösung (Xanthinfraktion) . . . . .	990
b) Untersuchung der Hypoxanthinfraktion . . . . .	994
2. Trennung der Basen in den salzsauren Mutterlaugen der Harnsäure. (Krüger und Salomon) . . . . .	997
Anhang . . . . .	1000
C. Die Harnsäure . . . . .	1006
Vorkommen . . . . .	1001
Synthesen . . . . .	1001
Physiologisches Verhalten . . . . .	1001
Eigenschaften . . . . .	1010
Verbindungen . . . . .	1014
a) Mit Basen. Die Urate . . . . .	1014
b) Verbindungen von Säuren . . . . .	1023
Verhalten der Harnsäure im Harn . . . . .	1032
Darstellung . . . . .	1037
Nachweis . . . . .	1041
Bestimmung . . . . .	1043
I. Der reinen Harnsäure . . . . .	1043
1. Acidimetrisch . . . . .	1043
2. Mit Permanganat . . . . .	1044
3. Als Silber-Magnesiumsalz . . . . .	1046
a) Durch Bestimmung des Stickstoffgehalts . . . . .	1046
b) Durch Bestimmung des Silbergehalts . . . . .	1046
c) Durch Zurücktitrieren des Silberüberschusses . . . . .	1047
4. Andere Bestimmungsweisen . . . . .	1048
II. Bestimmung der im Harn enthaltenen Harnsäure . . . . .	1050
1. Nach Ludwig . . . . .	1051
2. Nach Krüger und Schmid . . . . .	1059
3. Nach Hopkins . . . . .	1060
4. Als Barytsalz . . . . .	1064
5. Als Zinksalz nach Bellocq . . . . .	1064
6. Durch Titrieren mit Silberlösung . . . . .	1064
7. Durch Reduktion von Jodsäure . . . . .	1065
a) Nach Ruhemann . . . . .	1065
b) Nach Merck . . . . .	1065

	Seite
8. Durch Reduktion von Silbersalz . . . . .	1065
9. Bestimmung der Harnsäure im Vogelharn nach Kossa . . .	1065
<b>D. Das Allantoin . . . . .</b>	1065
Bildung . . . . .	1068
Eigenschaften . . . . .	1070
Darstellung . . . . .	1072
Nachweis . . . . .	1073
Quantitative Bestimmung . . . . .	1075
1. Mittelst des Silbersalzes . . . . .	1075
2. Nach Wiechowski . . . . .	1076
a) Im Tierharn . . . . .	1077
b) Im Menschenharn . . . . .	1079
<b>Anhang: Urocaninsäure. Von A. Ellinger-Königsberg . . . .</b>	1081
Vorkommen . . . . .	1081
Eigenschaften . . . . .	1082
<b>Nucleinsäure. Von W. Wiechowski-Prag . . . . .</b>	1082 c
Eigenschaften, Erkennung . . . . .	1082 d
<b>Nucleinsäure . . . . .</b>	1082 e
Allgemeine Eigenschaften . . . . .	1082 f
Schicksal im Organismus . . . . .	1082 f
<b>A Die Nucleinsäuren im engeren Sinne . . . . .</b>	1082 i
I. Die tierischen Nucleinsäuren . . . . .	1082 i
a) Die Thymonucleinsäure . . . . .	1082 k
b) Die Harnnucleinsäure . . . . .	1082 o
Vorkommen, Nachweis . . . . .	1082 o
II. Die pflanzlichen Nucleinsäuren . . . . .	1082 p
<b>B. Nucleotide . . . . .</b>	1082 q
I. Guanylsäure . . . . .	1082 q
II. Inosinsäure . . . . .	1082 r
<b>C. Nucleoside . . . . .</b>	1082 s
I. Guanosinsäure und Xanthosin . . . . .	1082 s
II. Adenosin . . . . .	1082 t
III. Inosin und Carnin . . . . .	1082 t
1. Inosin . . . . .	1082 t
2. Carnin . . . . .	1082 u
Eigenschaften . . . . .	1082 u
<b>Die Eiweisskörper des Harns. Von F. N. Schulz-Jena . . . .</b>	1083
A. Allgemeines (Einteilung der Eiweissstoffe) . . . . .	1083
B. Löslichkeitsverhältnisse . . . . .	1084
C. Koagulation . . . . .	1085
D. Das Aussalzen . . . . .	1086
E. Optische Aktivität . . . . .	1087
F. Fällung durch Schwermetalle . . . . .	1087
G. Fällungsreaktionen (Alkaloidreaktionen) . . . . .	1087
H. Verhalten gegen Anilinfarben . . . . .	1088
I. Farbenreaktionen . . . . .	1089
<b>Allgemeines über Vorkommen . . . . .</b>	1096
I. Der normale Eiweissgehalt . . . . .	1097
II. Die verschiedenen Eiweissstoffe . . . . .	1101



	Seite
I. Albumin . . . . .	1101
Eigenschaften . . . . .	1101
Nachweis . . . . .	1106
1. Fällung als koaguliertes Eiweiss . . . . .	1106
2. „ „ Acidalbumin . . . . .	1110
3. „ „ durch spezifische Reagentien . . . . .	1112
4. Nachweis von Albumin als solchem . . . . .	1122
Abscheidung . . . . .	1124
Quantitative Bestimmung . . . . .	1127
I. Bestimmung des Gesamteiweisses . . . . .	1127
II. Gesonderte Bestimmung des Globulins und Albumins . . . . .	1150
II. Globuline . . . . .	1153
1. Serumglobulin . . . . .	1154
Vorkommen . . . . .	1154
Eigenschaften . . . . .	1156
Nachweis . . . . .	1158
2. Fibrinogen . . . . .	1161
3. Fibrin . . . . .	1162
III. Die mit Essigsäure fällbaren Eiweissstoffe . . . . .	1163
A. Das typische Harnmucoid . . . . .	1165
Vorkommen, Eigenschaften . . . . .	1165
Darstellung . . . . .	1168
Nachweis . . . . .	1169
B. Die mucinähnliche Substanz . . . . .	1170
C. Die durch Essigsäure fällbaren Eiweissverbindungen (Mörner) . . . . .	1173
Eigenschaften . . . . .	1173
Nachweis . . . . .	1177
D. Phosphorproteide des Harns . . . . .	1179
Vorkommen . . . . .	1179
Eigenschaften . . . . .	1180
I. Nucleoalbumine . . . . .	1180
II. Nucleoproteide . . . . .	1181
III. Nucleohiston . . . . .	1181
IV. Histon . . . . .	1183
E. Der Bence-Jonessche Eiweisskörper . . . . .	1184
F. Krystallisierte Eiweisskörper des Harns . . . . .	1190
IV. Die Albumosen des Harns (Allgemeines) . . . . .	1191
1. Die Verdauungsalbumosen . . . . .	1194
2. Das Verdauungspepton . . . . .	1200
3. Die Harnalbumosen . . . . .	1201
Vorkommen . . . . .	1201
Eigenschaften . . . . .	1205
Nachweis . . . . .	1208
Bestimmung . . . . .	1216
V. Hämoglobin . . . . .	1217
Vorkommen . . . . .	1217
Eigenschaften . . . . .	1218
Nachweis . . . . .	1221
VI. Methämoglobin . . . . .	1233
VII. Proteinsäuren . . . . .	1234
A. Vorkommen und Bedeutung . . . . .	1234
B. Die einzelnen Proteinsäuren . . . . .	1237
I. Antoxyproteinsäure . . . . .	1237
Eigenschaften . . . . .	1237
Darstellung und Nachweis . . . . .	1238

	Seite
II. Oxyproteinsäure . . . . .	1239
Eigenschaften . . . . .	1239
Nachweis und Darstellung . . . . .	1240
III. Alloxyproteinsäure . . . . .	1242
Eigenschaften . . . . .	1242
Nachweis und Darstellung . . . . .	1243
IV. Uroferrinsäure . . . . .	1243
V. N-haltige Säure von Hári . . . . .	1246
VI. Polypeptidartige Körper . . . . .	1247
C. Quantitative Bestimmung . . . . .	1248
Anhang: Die Diazoreaktion . . . . .	1252
VIII. Eiweissabkömmlinge . . . . .	1256
1. Chondroitinschwefelsäure . . . . .	1256
2. Nukleinsäure . . . . .	1264
3. Fleischsäure . . . . .	1267
4. Gallensäuren . . . . .	1272
Vorkommen . . . . .	1272
Eigenschaften . . . . .	1273
Nachweis . . . . .	1278
<b>Die Harnfarbstoffe. Von F. N. Schulz-Jena . . . . .</b>	<b>1283</b>
I. Urochrom (siehe auch S. 878—903) . . . . .	1286
Vorkommen . . . . .	1286
Ursprung . . . . .	1288
1. Das Urochrom von Dombrowski . . . . .	1289
Eigenschaften . . . . .	1289
Darstellung . . . . .	1292
Bestimmung . . . . .	1293
2. Das Urochrom von Hohlweg . . . . .	1294
Eigenschaften . . . . .	1294
Darstellung . . . . .	1295
3. Das Urochrom von Garrod . . . . .	1297
Herkunft, Eigenschaften . . . . .	1297
Darstellung . . . . .	1299
Nachweis . . . . .	1301
4. Das Urochrom nach Thudichum . . . . .	1301
5. Chromoxyproteinsäure von Bocchi und Ghelfi . . . . .	1303
6. Urochrom von Weisz . . . . .	1303
7. Harnfarbstoffe von Schunck . . . . .	1306
8. Derivate von Urochrom . . . . .	1306
a) Uromelanin von Plósz . . . . .	1307
b) Uromelanin von Dombrowski . . . . .	1307
c) Bromuopyrryl . . . . .	1308
d) Die Huminsubstanz von Udránszky . . . . .	1309
e) Die braunen bei der Rosenbachschen Methode entstehenden Stoffe . . . . .	1310
f) Präformierte Huminsubstanz nach v. Udránszky . . . . .	1310
g) Die Karbolharne . . . . .	1311
II. Melanin und Melanogen . . . . .	1313
Vorkommen . . . . .	1313
Eigenschaften . . . . .	1314
Nachweis . . . . .	1316
III. Hämatin . . . . .	1317
Vorkommen, Eigenschaften . . . . .	1317
Nachweis . . . . .	1318

	Seite
IV. Hämatoporphyrin . . . . .	1319
Vorkommen . . . . .	1319
Eigenschaften . . . . .	1322
Nachweis . . . . .	1334
Darstellung . . . . .	1342
Bestimmung . . . . .	1343
V. Urorubrohämatin und Urofuscöhämatin . . . . .	1344
VI. Gallenfarbstoffe . . . . .	1345
Vorkommen . . . . .	1345
Eigenschaften . . . . .	1346
a) Bilirubin . . . . .	1346
b) Biliverdin . . . . .	1350
c) Biliprasin . . . . .	1351
d) Bilifusein . . . . .	1351
e) Cholecyanin . . . . .	1352
f) Choletelin . . . . .	1353
g) Der reduzierbare Stoff von Stokvis . . . . .	1354
Nachweis . . . . .	1355
I. In Harn direkt . . . . .	1355
II. Durch Isolierung . . . . .	1359
III. In Uratsedimenten . . . . .	1366
IV. Nachweis der einzelnen Gallenfarbstoffe . . . . .	1366
Bestimmung des Bilirubins . . . . .	1367
VII. Urobilin und Urobilinogen . . . . .	1370
I. Urobilin . . . . .	1370
Vorkommen . . . . .	1370
Eigenschaften . . . . .	1379
Darstellung . . . . .	1387
Nachweis . . . . .	1392
Bestimmung . . . . .	1398
II. Urobilinogen . . . . .	1404
Vorkommen . . . . .	1405
Eigenschaften . . . . .	1405
Nachweis . . . . .	1407
Darstellung . . . . .	1410
Bestimmung . . . . .	1411
<b>Zufällige Bestandteile . . . . .</b>	<b>1414</b>
I. Teil. <b>Anorganische Körper.</b> Von K. Spiro-Strassburg i. E. . . . .	1414
A. Metalle . . . . .	1414
1. Quecksilber . . . . .	1414
Vorkommen . . . . .	1414
Eigenschaften . . . . .	1415
Nachweis . . . . .	1416
Bestimmung . . . . .	1419
1. Nach Winternitz . . . . .	1419
2. Nach Jolles . . . . .	1420
3. Nach Ludwig und Zillner . . . . .	1420
4. Nach Schuhmacher II und W. Jung . . . . .	1420
a) Gravimetrisches Verfahren . . . . .	1420
b) Colorimetrisches Verfahren . . . . .	1421
5. Nach Ernst Jäneke . . . . .	1422
6. Nach P. E. Raaschou und E. Hintz . . . . .	1423
7. Nach C. Siebert . . . . .	1424
8. Nach P. Farup . . . . .	1425

	Seite
2. Arsen . . . . .	1427
Vorkommen . . . . .	1427
Eigenschaften . . . . .	1428
Nachweis . . . . .	1429
I. Zerstörung der organischen Substanz . . . . .	1429
1. Nach Fresenius mit Kaliumchlorat und Salzsäure . . . . .	1429
2. Schmelzverfahren. Nach E. Salkowski . . . . .	1430
3. Säureverfahren. Nach E. Salkowski . . . . .	1430
4. Nach G. Lockemann. . . . .	1430
II. Nachweis im Marshschen Apparat . . . . .	1434
5. Nach E. Reichardt . . . . .	1436
6. Nach O. E. Carlson . . . . .	1437
7. Nach Ch. Sanger und C. F. Black . . . . .	1438
8. Nach Gutscheid-Burnaschew . . . . .	1438
Bestimmung . . . . .	1438
3. Antimon . . . . .	1439
4. Blei . . . . .	1439
5. Silber . . . . .	1439
6. Thallium . . . . .	1440
7. Cadmium . . . . .	1440
8. Lithium . . . . .	1440
9. Wismut . . . . .	1441
B. Säuren . . . . .	1441
1. Pyrophosphorsäure . . . . .	1441
2. Chlorsäure . . . . .	1442
3. Jodwasserstoff . . . . .	1443
Bestimmung des Jodwasserstoffs . . . . .	1444
I. Verfahren von Kersting . . . . .	1444
II. Verfahren von Hilger . . . . .	1446
III. Verfahren von Pečirka . . . . .	1446
IV. Verfahren von Harnack . . . . .	1447
V. Verfahren von Wallace und Lamont . . . . .	1447
VI. Verfahren von Sandlund . . . . .	1447
VII. Verfahren von Nicolle . . . . .	1448
VIII. Verfahren von Nencki und Schoumow-Simanowsky . . . . .	1448
IX. Verfahren von Vielliers und Fayolle . . . . .	1449
X. Verfahren von Jolles . . . . .	1449
XI. Colorimetrisches Verfahren von Struve . . . . .	1449
XII. Nach H. Anten . . . . .	1449
4. Bromwasserstoff . . . . .	1450
Bestimmung des Bromwasserstoffs . . . . .	1451
I. Nach Berglund . . . . .	1451
II. Nach Nicolle . . . . .	1452
III. Nach Caigniet . . . . .	1452
IV. Indirektes Verfahren . . . . .	1452
5. Bromsäure . . . . .	1453
6. Borsäure . . . . .	1453
II. Teil. Organische Stoffe. Von F. N. Schulz-Jena . . . . .	1455
Äthylalkohol . . . . .	1455
Vorkommen . . . . .	1455
Eigenschaften, Nachweis . . . . .	1456
Quantitative Bestimmung . . . . .	1456

	Seite
Methylalkohol . . . . .	1458
Vorkommen, Eigenschaften, Nachweis . . . . .	1458
Bestimmung . . . . .	1459
Chloroform . . . . .	1459
Vorkommen . . . . .	1459
Eigenschaften, Nachweis . . . . .	1460
Bestimmung . . . . .	1461
Jodoform . . . . .	1461
Chloralhydrat . . . . .	1461
Urochloralsäure . . . . .	1462
Vorkommen, Eigenschaften, Nachweis . . . . .	1462
Sulfonal . . . . .	1463
Vorkommen, Eigenschaften, Nachweis . . . . .	1463
Tetronal und Trional . . . . .	1464
Kakodylsäure . . . . .	1464
Vorkommen, Eigenschaften, Nachweis . . . . .	1464
Piperazin . . . . .	1464
Vorkommen . . . . .	1464
Eigenschaften, Nachweis . . . . .	1465
Hexamethylenetetramin. Urotropin . . . . .	1465
Vorkommen, Nachweis . . . . .	1465
Bestimmung nach Schröter . . . . .	1466
Veronal . . . . .	1466
Vorkommen . . . . .	1466
Eigenschaften, Nachweis . . . . .	1467
Salicylsäure . . . . .	1467
Vorkommen, Eigenschaften . . . . .	1467
Nachweis . . . . .	1468
Salicylursäure . . . . .	1469
Eigenschaften, Nachweis . . . . .	1469
Pikrinsäure . . . . .	1469
Guajacol . . . . .	1469
Vorkommen . . . . .	1469
Eigenschaften, Nachweis, Bestimmung . . . . .	1470
Thymol. Methylpropylphenol . . . . .	1471
Vorkommen, Eigenschaften, Nachweis . . . . .	1471
Naphthalin und Naphthol . . . . .	1472
Vorkommen, Nachweis . . . . .	1472
Copaivaharn . . . . .	1473
Piperazin . . . . .	1475
Lysidin . . . . .	1475
Anthrachinonharne . . . . .	1475
Santonin . . . . .	1476
Sandelöl . . . . .	1478
Anilin . . . . .	1479
Acetanilid . . . . .	1480
Phenacetin . . . . .	1480
Antipyrin . . . . .	1481
Pyramidon . . . . .	1482
Nitrobenzol . . . . .	1483
Alkaloide . . . . .	1484
I. Chinin . . . . .	1484
Vorkommen, Eigenschaften . . . . .	1484
Nachweis . . . . .	1485
Bestimmung . . . . .	1487
II. Cinchonin . . . . .	1490
III. Chinolinharne . . . . .	1490



	Seite
IV. Morphinum . . . . .	1491
Vorkommen, Eigenschaften . . . . .	1491
Nachweis im Harn . . . . .	1492
V. Codein . . . . .	1494
VI. Strychnin . . . . .	1494
VII. Theobromin und Caffein . . . . .	1495
Auftreten, Eigenschaften . . . . .	1495
Darstellung . . . . .	1496
Anhang. Glykuronsäure und gepaarte Glykuronsäuren . . . . .	1497
I. Glykuronsäure . . . . .	1497
Vorkommen . . . . .	1497
Eigenschaften . . . . .	1498
II. Gepaarte Glykuronsäuren . . . . .	1505
1. Allgemeines . . . . .	1505
2. Die Glykuronsäuren des normalen Harns . . . . .	1510
3. Die unter besonderen Bedingungen auftretenden Glykuronsäuren . . . . .	1511
4. Der Nachweis der gepaarten Glykuronsäuren . . . . .	1517
5. Die quantitative Bestimmung der gepaarten Glykuronsäuren . . . . .	1518
<b>Enzyme.</b> Von weiland F. Falk und H. Eppinger-Wien . . . . .	1522
1. Harn-Pepsin . . . . .	1523
Vorkommen . . . . .	1523
Nachweis und Bestimmung der peptischen Wirksamkeit . . . . .	1525
A. Das Fibrinflocken-Verfahren . . . . .	1526
B. Das Casein-Verfahren . . . . .	1528
C. Ricin-Verfahren . . . . .	1528
D. Edestin-Verfahren . . . . .	1529
2. Harn-Trypsin und Antitrypsin . . . . .	1530
Vorkommen . . . . .	1530
<b>Harn-Sedimente.</b> Von weiland F. Falk und H. Eppinger-Wien . . . . .	1540
A. Nichtorganisierte Sedimente . . . . .	1540
1. Harnsäure und harnsaure Salze (Urate) . . . . .	1542
Vorkommen, Bildung . . . . .	1542
Eigenschaften . . . . .	1546
2. Phosphorsaure Salze . . . . .	1549
Vorkommen und Bildung . . . . .	1549
Eigenschaften . . . . .	1552
3. Oxalsaurer Kalk . . . . .	1554
Vorkommen . . . . .	1554
Eigenschaften . . . . .	1556
Nachweis . . . . .	1557
4. Schwefelsaurer Kalk . . . . .	1557
Vorkommen . . . . .	1557
Bildung, Eigenschaften . . . . .	1558
Nachweis . . . . .	1559
5. Kohlensaurer Kalk . . . . .	1559
Vorkommen, Bildung, Eigenschaften . . . . .	1559
Nachweis . . . . .	1560
6. Hippursäure . . . . .	1560
Vorkommen, Eigenschaften . . . . .	1560
7. Cystin . . . . .	1560
Vorkommen und Bildung . . . . .	1560
Eigenschaften . . . . .	1561

	Seite
8. Xanthin . . . . .	1561
Vorkommen und Eigenschaften . . . . .	1561
Nachweis . . . . .	1562
9. Leucin und Tyrosin . . . . .	1562
Vorkommen und Bildung . . . . .	1562
Eigenschaften . . . . .	1563
10. Heteroalbumose . . . . .	1564
11. Cholesterin . . . . .	1565
Vorkommen, Eigenschaften . . . . .	1565
12. Fett, Fettsäurenadeln und „Lipoide“ . . . . .	1566
Vorkommen und Bildung . . . . .	1566
Nachweis . . . . .	1567
13. Pigmente . . . . .	1567
a) Indigblau, Indigrot . . . . .	1568
Vorkommen und Bildung . . . . .	1568
Eigenschaften . . . . .	1569
b) Bilirubin (Hämatoidin) . . . . .	1570
Vorkommen, Eigenschaften . . . . .	1570
c) Uroerythrin . . . . .	1571
Vorkommen . . . . .	1571
d) Rubazonsäure . . . . .	1571
Überblick über die nichtorganisierten Sedimente . . . . .	1571
B. Organisierte Sedimente. Untersuchungs-Methodik . . . . .	1573
1. Elemente des Blutes . . . . .	1577
a) Erythrocyten . . . . .	1577
Vorkommen . . . . .	1577
b) Leukocyten . . . . .	1579
c) Fibringerinnsel . . . . .	1580
2. Elemente des Epithelbelags und der Drüsen . . . . .	1580
a) Epithelien . . . . .	1580
b) Geschwulstpartikel . . . . .	1582
c) Spermatozoen . . . . .	1582
d) Schleimsedimente . . . . .	1583
e) Cylindroide . . . . .	1584
f) Urethralfäden . . . . .	1585
3. Harneylinder . . . . .	1585
4. Harn-Mikroorganismen. Untersuchungsmethodik . . . . .	1589
A. Nichtpathogene Mikroorganismen . . . . .	1591
1. Schimmel- und Sprosspilze . . . . .	1591
2. Spaltpilze . . . . .	1592
B. Pathogene Mikroorganismen . . . . .	1593
Tierische Parasiten . . . . .	1598
Harnkonkremente . . . . .	1600
A. Allgemeines . . . . .	1600
Vorkommen . . . . .	1600
Bildung . . . . .	1601
B. Spezielles . . . . .	1601
1. Uratsteine . . . . .	1602
2. Phosphatsteine . . . . .	1602
3. Calciumcarbonatsteine . . . . .	1602
4. Calciumoxalatsteine . . . . .	1603
5. Cystinsteine . . . . .	1603
6. Xanthinsteine . . . . .	1603
7. Indigosteine . . . . .	1604
8. Cholesterinsteine und sogenannte Urostealithen . . . . .	1604
9. Gemischte Steine . . . . .	1605
C. Analyse . . . . .	1605

	Seite
Anhang I. <b>Agglutinine und Lysine</b> . . . . .	1609
Lysogene und agglutinogene Substanzen . . . . .	1609
1. Agglutinine . . . . .	1609
2. Lysine . . . . .	1610
3. Agglutinogene und lysogene Substanzen . . . . .	1611
Anhang II. <b>Berichtigungen und Ergänzungen</b> . . . . .	1613
Bestimmung des reduzierenden Zuckers nach Stanley R. Benedict . . . . .	1613
Darstellung von Normalsalzsäure nach G. A. Hulett und W. D. Bonner . . . . .	1614
Anhang III. <b>Tabellen</b> . . . . .	1615
Atom- und Molekulargewichte und deren Logarithmen . . . . .	1615
Zur Berechnung der Analysen . . . . .	1615
Volumetrische Stickstoffbestimmung . . . . .	1616
Annähernde Zusammensetzung der Reagentien nach Emil Fischer . . . . .	1616
<b>Logarithmen</b> . . . . .	1617
<b>Sachregister</b> . . . . .	1623
<b>Tafeln.</b>	



## Diamine.

Von A. Ellinger, Königsberg i. Pr.

A. Vorkommen. Das Tetramethyldiamin (Putrescin) und das Pentamethyldiamin (Cadaverin) sind von v. Udránszky und E. Baumann im Harn eines an Cystinurie Leidenden aufgefunden worden, das Cadaverin allein in zwei anderen Fällen von Cystinurie von Stadthagen u. Brieger; in dem Fall von v. Udránszky u. Baumann enthielt der Harn nach García<sup>1)</sup> später nur Putrescin.

In dem Fall von v. Udránszky und Baumann wurden aus dem Harn täglich meist 0,2—0,4 g Benzoyldiamine gewonnen, von denen nur  $\frac{1}{4}$ — $\frac{1}{3}$  auf das Putrescin kam; an anderen Tagen überwog wieder das Putrescin. Die Untersuchung wurde im Laufe von mehr als einem Jahr an 50 Tagen vorgenommen und einmal 8 Tage hintereinander so gut wie kein Diamin aufgefunden, während die Cystinurie anhielt. Bei an Kohlenhydraten reicher Kost sank nach García das Diamin auf  $\frac{1}{3}$ — $\frac{1}{4}$ , nahm aber bei Zulage von Käse zur Kost zu. In diesem Fall sowie in einem von Stadthagen und Brieger bestand zugleich Blasenkatarrh. In den Exkrementen des Kranken von v. Udránszky und Baumann waren die Basen gleichfalls enthalten (bis 0,5 g im Tag), mit nur 10—15 % Pentamethyldiamin; in dem einen Fall von Stadthagen und Brieger, in welchem der Kot auf die Diamine untersucht wurde, fehlten sie.

Die Diamine sind keineswegs regelmässige Begleiter des Cystins im Harn, in vielen Fällen fehlen sie ganz, zuweilen wurde nur eines von beiden gefunden. Nach einer Zusammenstellung von Garrod<sup>2)</sup> wurden weiterhin Diamine gefunden in Fällen von Bödtker, C. E. Simon, Riegler, Marriott u. Wolf, Thiele, Cammidge, Schölberg und in vier Fällen von Garrod; sie wurden vermisst

<sup>1)</sup> L. v. Udránszky und E. Baumann, Berichte d. chem. Gesellsch. **21**. 2744. u. 2938. 1888; Zeitschr. f. physiol. Chem. **13**. 562. 1889. — Stadthagen und Brieger, Virchows Archiv **115**. 490. 1889; Berliner klin. Wochenschr. 1889. 345. — S. A. García, Zeitschr. f. physiol. Chem. **17**. 568. 1892.

<sup>2)</sup> A. E. Garrod, Inborn errors of metabolism. Croonian Lectures 1908. London 1909. S. 121, dort Literatur und A. E. Garrod and W. H. Hurtley, Journ. of Physiol. **34**. 216. 1906. (Lit.)

in fünf Fällen von Garrod, einem Fall von Baumann und bei den von Cohn, Alsberg u. Folin, Loewy u. Neuberg, Hurteley und Hele beobachteten Cystinurikern.

Nach dem Urteil von Garrod, dem die grössten eigenen Erfahrungen über Cystinurie-Harne zu Gebote stehen, muss man an vielen Tagen auf Diamine untersuchen, um einmal nachweisbare Mengen zu finden.

Von den beiden Diaminen ist Cadaverin öfter im Harn, Putrescin häufiger in den Fäces gefunden worden.

Bei der Verarbeitung von 100 Liter normalen Harns fand Dombrowski nachweisbare Mengen von Cadaverin (Isolierung s. S. 710), Hunter will Spuren von Benzoyl-Diaminen aus grossen Harnmengen von Patienten mit perniciöser Anämie, Gardeur Cadaverin aus dem Harn von Melancholikern erhalten haben. In den Fäces fand Roos<sup>1)</sup> Cadaverin bei einem Dysenterie-Kranken und Putrescin in einem Fall von Cholera nostras; der Harn dieser Patienten wurde nicht geprüft. Bei mehreren Fällen von Cholera asiatica stellte Roos aus dem Stuhl Benzoyldiamine dar, fand aber keine Diamine im Harn.

Über die Herkunft der Diamine, die zuerst von Brieger als Fäulnisprodukte von Leichenteilen isoliert wurden, liegen folgende Erfahrungen vor: Sie entstehen in reichlicher Menge durch bakterielle Zersetzung der entsprechenden Diaminocarbonsäuren Ornithin und Lysin (Ellinger, Ackermann) und sind aufgefunden bei autolytischer Magen- und Pankreasverdauung (Lawrow, Werigo, Steyrer), bei Digestion von Lebergewebe und Ornithin (Dakin) und bei sehr langer Einwirkung von Pepsin-Schwefelsäure auf krystallisiertes Ovalbumin (Langstein). Inwieweit die Mitwirkung von Bakterien in diesen Versuchen ausgeschlossen war, lässt sich aus den Angaben nicht mit voller Sicherheit feststellen. Von grösster Wichtigkeit ist die Beobachtung von Loewy und Neuberg<sup>2)</sup>, dass im Harn eines Cystinurikers, der sonst keine Diamine im Harn ausschied, nach Verzehren von Arginin Putrescin, von Lysin Cadaverin in beträchtlichen Mengen erschien.

<sup>1)</sup> St. Dombrowski, Arch. Polon. des sciences biolog. et médicales. **2**. 1903. Sep.-Abdr. 11 S. — W. Hunter, Transact. of the Med. Soc. of London **13**. 386. 1890, zit. nach Garrod. — A. Gardeur, Méthode de recherche des poisons physiologiques dans les urines. Bruxelles 1898. Travaux de labor. de l'Inst. Solvay II. H. 1. — E. Roos, Zeitschr. f. physiol. Chem. **16**. 192. 1892. — E. Roos, Berl. klin. Wochenschr. 1893. Nr. 15.

<sup>2)</sup> L. Brieger, Untersuchungen über Ptomaine. I—III. Berlin 1885/86. — A. Ellinger, Zeitschr. f. physiol. Chem. **29**. 334. 1900. — D. Ackermann, Zeitschr. f. physiol. Chem. **60**. 482. 1909 und **64**. 91. 1910. — D. Lawrow, Zeitschr. f. physiol. Chem. **33**. 312. 1901. — B. Werigo, Pflügers Arch. **51**. 362. 1891. — A. Steyrer, Hofm. Beitr. **1**. 506. 1902. — H. D. Dakin, Journ. of biol. chem. **1**. 171. 1905/06. — L. Langstein, Hofm. Beitr. **2**. 229. 1902. — A. Loewy und C. Neuberg, Zeitschr. f. physiol. Chem. **43**. 338. 1904.

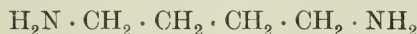
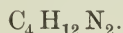


Baumann und v. Udránszky nahmen — entsprechend dem damaligen Stand der Kenntnisse über die Entstehung der Diamine — an, dass die Basen infolge eines anormalen Vorganges im Darm in grosser Menge entstünden, zumal sie auch in den Exkrementen regelmässig ausgeschieden wurden. Aber alle Versuche, charakteristische Bakterien aus dem Darminhalt zu züchten oder durch Darmdesinfektion die Diaminurie zu unterdrücken, waren vergeblich. Moreigne und Simon<sup>1)</sup> dagegen betrachteten die Diaminurie als eine Störung des intermediären Eiweissabbaues. Wiewohl diese Anschauung durch den Befund von Loewy und Neuberg eine starke Stütze erhalten hat, so ist sie bisher ebensowenig erwiesen wie die ältere, weil bisher keine Erfahrungen über das Verhalten von Arginin und Lysin bei subkutaner Darreichung an Cystinuriker vorliegen.

Auch bliebe bei der Annahme, dass die Diamine ausserhalb des Darmkanals entstehen, ihre Ausscheidung in den Fäces zu erklären. Denn nach einer Angabe von Neuberg<sup>2)</sup> waren bei den genannten Versuchen am Cystinuriker in den Fäces keine Diamine nachweisbar.

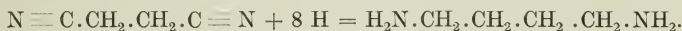
Die Menge der ausgeschiedenen Diamine scheint nach García und Thiele<sup>3)</sup> von der Eiweisszufuhr abhängig zu sein.

## I. Putrescin.



Syn. Tetramethyldiamin, 1,4-Diaminobutan.

Die Identität des Putrescins und Tetramethyldiamins ist von v. Udránszky und Baumann nachgewiesen, die Konstitution von Ladenburg<sup>4)</sup> festgestellt, der es durch Reduktion von Äthylencyanid mit Natrium in alkoholischer Lösung erhielt.



Eigenschaften<sup>5)</sup>. 1. Das Tetramethyldiamin bildet eine farblose, ziemlich dünne Flüssigkeit von Spermaeruch, welcher von dem

<sup>1)</sup> H. Moreigne, Arch. de méd. exper. 11. 254. 1899. — C. E. Simon, Amer. Journ. of med. sciences. 119. 39. 1900, zit. nach Garrod.

<sup>2)</sup> C. Neuberg, Handbuch d. Biochemie von C. Oppenheimer, IV. 2. S. 352. Jena 1910.

<sup>3)</sup> García a. a. O. — F. H. Thiele, Journ. of Physiol. 36. 68. 1907.

<sup>4)</sup> L. v. Udránszky und E. Baumann, Ber. d. chem. Ges. 21. 2938. 1888. — A. Ladenburg, Ber. d. chem. Ges. 19. 780. 1886.

<sup>5)</sup> Brieger, Untersuchungen über Ptomaine 2. 42. 54. 57. 63; 3. 24. 100. — Bocklisch, Berichte d. chem. Gesellsch. 18. 1925. 1885. — Ladenburg, Berichte d. chem. Gesellsch. 19. 780. 1886. — v. Udránszky und Baumann, Ber. 21. 2744. 1888 u. a. a. O.

des Cadaverins kaum verschieden ist, raucht etwas an der Luft, zieht leicht Kohlensäure an, erstarrt in niedriger Temperatur und schmilzt bei 23—24°, nach Kaufler<sup>1)</sup> bei 27° wieder, siedet bei 158—160°, ist mit Wasserdämpfen schwer flüchtig und wird durch Destillieren mit Kalilauge nicht zerstört. Löst sich leicht in Wasser, schwer in Äther. Ist optisch inaktiv und wie das Cadaverin wenig giftig.

2. Das Chlorhydrat,  $C_4H_{12}N_2$ ,  $2HCl$ , lange, farblose, transparente Nadeln oder weiche tafelförmige Krystalle, ist nicht hygroskopisch, löst sich sehr leicht in Wasser, schwer in verdünntem Alkohol, nicht in absolutem Alkohol und in Äther. — Das Sulfat bildet gut ausgebildete, nicht zerfließliche Krystalle. — Das Platinsalz  $C_4H_{12}N_2$ ,  $H_2PtCl_6$  krystallisiert in meist zu Drusen verwachsenen Nadeln oder in sechsseitigen, häufig übereinander geschichteten Plättchen und löst sich schwer in Wasser. — Das Goldsalz  $C_4H_{12}N_2$ ,  $2HAuCl_4$ ,  $2H_2O$  krystallisiert in Plättchen und ist schwer löslich. — Die Quecksilberchloridverbindung ist leicht löslich; aus alkoholischer Lösung kann aber die Base durch alkoholische Sublimatlösung gefällt werden. — Das Pikrat scheidet sich auf Zusatz von Pikrinsäure zur Lösung des Chlorids in seidenglänzenden, verfilzten, dünnen, gelben Nadeln ab, ist in kaltem Wasser fast unlöslich. — Das Pikrolonat  $C_4H_{12}N_2$ ,  $2C_{10}H_8N_4O_5$ , aus dem Carbonat und wässriger Pikrolonsäure oder aus der Lösung des Chlorhydrats und der Pikrolonsäure in Alkohol erhalten, bildet gelbe Nadeln vom Zersetzungspunkt 263°, die in Wasser und Alkohol in der Kälte sehr schwer, in der Wärme etwas mehr löslich sind (Otori)<sup>2)</sup>.

3. Alkaloidreaktionen. Die freie Base gibt mit Phosphorwolframsäure einen weissen, im Überschuss löslichen Niederschlag, mit Phosphormolybdänsäure einen gelben, mit Kaliumquecksilberchlorid, Kaliumwismuthjodid und Kaliumcadmiumjodid ölige, bald krystallinisch werdende Niederschläge, mit Gerbsäure einen schmutzig weissen.

Die Niederschläge des Chlorids sind mit Phosphorwolframsäure weiss, mit Phosphormolybdänsäure gelb, mit Kaliumquecksilberchlorid und Kaliumwismuthjodid amorph, bald zu Nadeln erstarrend, mit Jodjodkalium und Jodjodwasserstoff braun, krystallinisch. Kaliumcadmiumchlorid gibt keinen Niederschlag.

4. Dibenzoyl-Tetramethyldiamin,  $C_4H_8(NH-CO-C_6H_5)_2$ , krystallisiert in seidenglänzenden Plättchen oder farblosen Nadeln, schmilzt bei 175—176°, ist in Wasser unlöslich, fast unlöslich in Äther, schwer löslich in kaltem Weingeist, leicht beim Erwärmen; Gegenwart fremder Substanzen in den Lösungsmitteln erhöht die Löslichkeit wie beim Benzoyl-Cadaverin. Die Verbindung sublimiert beim Erhitzen unzersetzt. Beim Erhitzen in alkoholischer Lösung mit Salz-

<sup>1)</sup> F. Kaufler, Chemiker-Zeitg. 25. 133. 1901.

<sup>2)</sup> J. Otori, Zeitschr. f. physiol. Chem. 43. 305. 1904.



säure zersetzt sie sich leichter als die des Cadaverins. Sie wird gewonnen wie die des Cadaverins (v. Udránszky und Baumann).

5. Die Verbindung mit Phenylcyanat  $C_6H_5 \cdot HN \cdot CO \cdot NH \cdot (CH_2)_4 \cdot NH \cdot CO \cdot NH \cdot C_6H_5$  erhält man nach Loewy u. Neuberg<sup>1)</sup> folgendermassen: 0,88 g Putrescin werden in 50 ccm absolut trockenem Äther gelöst, resp. suspendiert, und unter Kühlung durch Eis mit 2,5 g Phenylcyanat, gelöst in 30 ccm Äther, versetzt. Momentan scheidet sich der Harnstoff unter lebhafter Reaktion in quantitativer Ausbeute ab. Nach dem Waschen mit Äther ist die Verbindung rein. Der Schmelzpunkt liegt bei  $240^\circ$  (korr.). Sie ist unlöslich in Wasser, Aceton, Benzol, Ligroin, Essigäther, Schwefelkohlenstoff und kaltem Alkohol. Von letzterem wird sie in der Siedehitze spurenweise aufgenommen. Sie ist löslich in heissem Nitrobenzol, Anilin und namentlich in warmem Pyridin. Aus diesem oder einem Gemisch von Pyridin mit Aceton krystallisiert sie in Nadeln, Garben oder Büscheln.

6. Durch alternierende Behandlung mit methylalkoholischer Kalilauge und Jodmethyl lässt sich das Chlorhydrat des Tetramethyldiamins quantitativ zum diquaternären Ammoniumsalz methylieren (Willstätter und Heubner<sup>2)</sup>). Nach Abblasen des überschüssigen Holzgeists und Jodmethyls mit Wasserdampf wird die neutrale wässrige Lösung eingengt, die Hauptmenge des Jodkaliums durch fraktionierte Krystallisation abgetrennt und das restierende Gemisch von Jodkalium und Jodmethylat durch Schütteln mit gefällttem Chlorsilber in die Chloride verwandelt, deren Löslichkeitsverhältnisse mehr differieren. Durch Konzentrieren der wässrigen Lösung wird Chlorkalium abgeschieden, der Trockenrückstand des Filtrats mit wenig siedendem absolutem Alkohol aufgenommen und aus der alkoholischen Lösung das Hexamethyl-Tetramethyldiammoniumchlorid abgeschieden. Es krystallisiert aus Alkohol in tafelförmigen Prismen mit annähernd 2 Mol. Krystallwasser (exsiccator trocken), die bei  $125^\circ$  abgegeben werden. Wasserhaltig schmilzt das Salz bei  $116-117^\circ$ . Es ist in gleichen Teilen siedenden Alkohols löslich, auch leicht in kaltem Alkohol. — Das in orangegelben, vierseitigen Säulchen krystallisierende Chloroplatinat schmilzt bei  $279^\circ$ , das in gelben Prismen aus salzsäurehaltigem Wasser krystallisierbare Chloraurat zersetzt sich zwischen  $304-309^\circ$ . Das Pikrat ist mit Pikrinsäure aus der Lösung des Chlorids in goldgelben Prismen vom Zersetzungspunkt  $285^\circ$  fällbar. — Das Chlorid zeigt typische Curarinwirkung.

7. Beim Zusammenbringen von Putrescin und Formaldehydlösung tritt keine Abscheidung eines Polymerisationsproduktes ein im Gegensatz zum Cadaverin (Bischoff und Reinfeld<sup>3)</sup>).

8. Durch Einwirkung von salpetriger Säure entstehen 1,3-Butadien  $C_4H_6$ , Tetramethylenoxyd  $C_4H_8O$ , der Alkohol  $CH_2 \cdot CH \cdot CH_2 \cdot CH_2 \cdot OH$  und die beiden Glykole  $CH_3 \cdot CH \cdot (OH) \cdot CH_2 \cdot CH_2 \cdot OH$  und  $CH_2(OH) \cdot CH_2 \cdot CH_2 \cdot CH_2 \cdot OH$  (Demjanow<sup>4)</sup>).

9. Durch trockene Destillation des Chlorhydrats erhält man Pyrrolidinchlorhydrat (Ackermann<sup>5)</sup>).

<sup>1)</sup> A. Loewy und C. Neuberg, Zeitschr. f. physiol. Chem. **43**. 355. 1904.

<sup>2)</sup> R. Willstätter und W. Heubner, Ber. d. chem. Gesellsch. **40**. 3872. 1907.

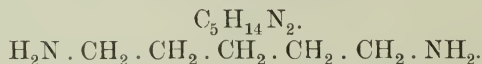
<sup>3)</sup> C. A. Bischoff und F. Reinfeld, Ber. d. chem. Gesellsch. **36**. 35. 1903.

<sup>4)</sup> N. Demjanow, Ber. d. russ. phys.-chem. Gesellsch. 1892. (1.) 346, zit. nach Ber. d. chem. Gesellsch. **25**. Ref. 912.

<sup>5)</sup> D. Ackermann, Zeitschr. f. physiol. Chem. **53**. 545. 1907/08.

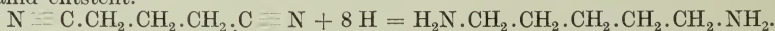
10. Physiologisches Verhalten: Nach Fütterung von 3 g des Chlorhydrats fanden v. Udránszky und Baumann<sup>1)</sup> 0,056 g der Benzoylverbindung im Harn. Die Dosis war ungiftig.

## II. Cadaverin.



Syn. Pentamethyldiamin, 1,5-Diaminopentan.

Die Konstitution ist durch den Nachweis der Identität mit dem von Ladenburg<sup>2)</sup> erhaltenen Produkt gesichert, das bei der Reduktion von Trimethylencyanid entsteht.



Eigenschaften<sup>3)</sup>. 1. Das Pentamethyldiamin bildet eine farblose, syrupöse Flüssigkeit von eigentümlichem Spermaeruch, raucht an der Luft, erstarrt in einer Kältemischung krystallinisch und schmilzt bei gewöhnlicher Temperatur wieder, siedet bei 178—179°, destilliert mit Kalilauge sowie mit Natronkalk unzersetzt, ist optisch inaktiv, wenig giftig (entzündungserregend). Löst sich leicht in Wasser, schwer in Alkohol, sehr schwer in Äther.

2. Es ist eine zweisäurige Base. Es zieht begierig Kohlensäure an und erstarrt dabei krystallinisch. — Mit Salzsäure und mit Schwefelsäure bildet es krystallisierende Salze, welche in Wasser, Weingeist und Ätheralkohol löslich, in absolutem Alkohol und in reinem Äther unlöslich sind. Das Chlorhydrat  $\text{C}_5\text{H}_{14}\text{N}_2 \cdot 2\text{HCl}$  besteht aus Nadeln, welche an der Luft zerfließen und bei 255° schmelzen (v. Braun); nach Gulewitsch krystallisiert das Salz aus Alkohol in sternförmig gruppierten Prismen, die an der Luft nicht zerfließen. — Das Chloroplatinat  $\text{C}_5\text{H}_{14}\text{N}_2$ ,  $\text{H}_2\text{PtCl}_6$ , rot-gelbe, vierseitige, an einem Ende zugespitzte Prismen, oder dem Platinsalmiak ähnliche Oktaeder, oder auch Nadelbüschel, nach Werigo glänzende braunrote Plättchen, ist schwer löslich (in 113 Teilen Wasser von 12°). Es schwärzt sich bei 215° und schmilzt einige Grade höher unter Zersetzung (v. Braun). — Das Chloraurat (trocken)  $\text{C}_5\text{H}_{14}\text{N}_2$ ,  $2\text{HAuCl}_4$  bildet lange, stark glänzende, gelbe, im Exsiccator verwitrende Nadeln oder Würfel vom Schmelzpunkt 186—188° und ist leicht löslich. — Von Verbindungen mit Quecksilberchlorid sind drei

<sup>1)</sup> L. v. Udránszky und E. Baumann, Zeitschr. f. physiol. Chem. 15. 80. 1890.

<sup>2)</sup> A. Ladenburg, Ber. d. chem. Gesellsch. 18. 2957. 1885.

<sup>3)</sup> A. Ladenburg, Ber. d. chem. Gesellsch. 16. 1149. 18. 2957 und 3100, 19. 780 und 2586. 20. 2217. — L. Brieger, Untersuchungen über Ptomaine 2. 36. 1885. 3. 24. 50. 54. 98. 1886. — Bocklisch, Ber. d. chem. Gesellsch. 18. 1925. 20. 1442 und 1445. — v. Udránszky und Baumann a. a. O. — J. v. Braun, Ber. d. chem. Gesellsch. 37. 3587. 1904. — Wl. Gulewitsch, Zeitschr. f. physiol. Chemie. 20. 287. 1894.

bekannt:  $C_5H_{14}N_2$ ,  $2 HCl$ ,  $2 HgCl_2$ ;  $C_5H_{14}N_2$ ,  $2 HCl$ ,  $3 HgCl_2$  und  $C_5H_{14}N_2$ ,  $2 HCl$ ,  $4 HgCl_2$ . Die erste entsteht nach Werigo aus dem Chlorid beim Behandeln desselben mit Quecksilberoxyd und einem Überschuss von Quecksilberchlorid, die zweite beim Vermischen einer wässerigen Lösung des Chlorids mit 4 Mol. Sublimat, die dritte bei Zusatz eines grösseren Überschusses von Quecksilberchlorid. Sie sind krystallinisch; die mit  $4 HgCl_2$  bildet farblose, lange Nadeln oder Plättchen, ist, wie die beiden anderen, in kaltem Wasser schwer, in heissem leicht löslich und schmilzt bei  $214-216^{\circ}$ ; das Salz von Werigo bildet mikroskopische, weisse, glänzende Plättchen. Auch aus alkoholischer Lösung wird das salzsaure Cadaverin durch alkoholische Sublimatlösung gefällt. — Das Pikrat  $C_5H_{14}N_2$ ,  $2 C_6H_2(NO_2)_3OH$ , dünne, gelbe Nadeln oder langgestreckte Tafeln, schmilzt bei  $221^{\circ}$  unter Gasentwicklung und ist in Wasser fast unlöslich. — Das Pikrolonat  $C_5H_{14}N_2$ ,  $2 C_{10}H_8N_4O_5$  entsteht wie das entsprechende Putrescinsalz und bildet Täfelchen oder Nadeln von orangefarbener Farbe, die sich bei  $220-250^{\circ}$  zersetzen und in Wasser und Alkohol schwer löslich sind (Otori). — Das neutrale Oxalat  $C_5H_{14}N_2 \cdot C_2H_2O_4$ ,  $2 H_2O$  bildet Nadeln und schmilzt bei  $160^{\circ}$ ; das saure Oxalat  $C_5H_{14}N_2 \cdot 2 C_2H_2O_4$ ,  $H_2O$  Plättchen vom Schmelzpunkt  $143^{\circ}$ . Beide Salze sind zwar in verdünntem Alkohol löslich, aber nicht in absolutem Alkohol und in Äther. — Ein Pentamethyldiammoniumcarbinat lässt sich durch Einleiten von Kohlensäure in die ätherische Lösung der Base bei der Temperatur des Äther-Kohlensäuregemisches als flockiges Salz erhalten, das erst bei  $10^{\circ}$  klebrig wird (Peters<sup>1)</sup>).

3. Die freie Base sowie das Chlorid geben ausserdem mit den gebräuchlichen Alkaloidreagentien Niederschläge.

Der Niederschlag der freien Base mit Phosphorwolframsäure ist weiss, im Überschuss löslich, mit Phosphormolybdänsäure weiss, krystallinisch, im Überschuss löslich, mit Phosphorantimonsäure weiss, krystallinisch, mit Kaliumquecksilberjodid harzig, mit Kaliumcadmiumjodid anfangs harzig, später in Krystallwarzen übergehend, mit Kaliumwismuthjodid und mit Jodjodkalium braun, mit Jodjodwasserstoff entstehen braune Nadeln, der Niederschlag mit Gerbsäure ist weiss, amorph. Kaliumplatinsulfocyanid fällt es nach Guareschi wie andere Amine auch. Metaphosphorsäure schlägt nach Schlömann<sup>2)</sup> das Pentamethyldiamin, wie die Diamine überhaupt, nieder.

Vom Chlorid hat der Niederschlag folgende Beschaffenheit: mit Phosphorwolframsäure weiss, im Überschuss leicht löslich, mit Phosphormolybdänsäure weiss, krystallinisch, mit Kaliumwismuthjodid rote Nadeln, mit Jodjodkalium und mit Jodjodwasserstoff braune Nadeln, mit chromsaurem Kali und konzentrierter Schwefelsäure rotbraun, bald verschwindend.

Eine Mischung von Ferricyankalium und Eisenchlorid wird durch die reine Base nicht blau gefärbt.

<sup>1)</sup> W. Peters, Ber. d. chem. Gesellsch. **40**. 1478. 1907.

<sup>2)</sup> Guareschi, Ber. d. chem. Gesellsch. **25**. R f. 7. 1892. — W. Schlömann, Ber. d. chem. Gesellsch. **26**. 1021. 1893.



4. Dibenzoyl - Pentamethyldiamin,  $C_5H_{10}(NH \cdot CO \cdot C_6H_5)_2$  (v. Udránszky und Baumann), krystallisiert in langen Nadeln und Plättchen, schmilzt bei  $130^0$  nach Baumann, bei  $135^0$  nach v. Braun, löst sich leicht in Weingeist, fast gar nicht in Äther, so gut wie nicht in Wasser; die Gegenwart fremder Substanzen in diesen Lösungsmitteln (Benzoesäure in Äther, Salze in Wasser) erhöht die Löslichkeit des Diamins. Verdünnte Säuren und Alkalien verändern die Verbindung beim Kochen nicht. Konzentrierte Schwefelsäure löst die Verbindung leicht, und Wasser fällt sie wieder unverändert. Erst bei tagelangem Kochen (mit konzentrierter Salzsäure in alkoholischer Lösung) erfolgt Spaltung derselben. Sie entsteht durch Schütteln einer wässerigen Lösung der freien Base mit Benzoylchlorid und Natronlauge.

Auf 10 cem Benzoylchlorid werden 80 cem Natronlauge von 10 % verwendet. Der entstehende Niederschlag wird in Weingeist gelöst und die Lösung durch viel Wasser gefällt, wobei die Benzoylverbindung aus der zunächst milchigen Flüssigkeit auskrystallisiert. Es lassen sich so noch einige mg der Base nachweisen. Die Lösung der Base braucht dazu nicht rein zu sein.

5. Schüttelt man die alkalische Lösung des Cadaverins mit Benzolsulfochlorid, so entsteht sehr bald eine klare Lösung, aus der durch Säuren in theoretischer Ausbeute das Dibenzolsulfocadaverin  $C_5H_{10}(NH \cdot SO_2 \cdot C_6H_5)_2$  als feines weisses Pulver gefällt wird, welches sich leicht in heissem, schwer in kaltem Alkohol löst und durch Umkrystallisieren aus Alkohol in farblosen, glänzenden Krystallen vom Schmelzpunkt  $119^0$  erhalten wird. Die Krystalle sind auch in verdünntem Alkali sehr leicht löslich (v. Braun).

6. Die Verbindung mit Phenylcyanat entsteht in gleicher Weise und Ausbeute wie beim Putrescin aus 1,02 g Cadaverin und 2,5 g Phenylcyanat. Auch im mikroskopischen Aussehen und den Löslichkeitsverhältnissen ähnelt sie der analogen Putrescinverbindung, nur die Löslichkeit in Pyridin ist etwas grösser (Loewy und Neuberg). Der Schmelzpunkt liegt bei  $207-209^0$ .

7. Beim Einbringen von 30 % iger Formaldehydlösung in 10 % ige wässerige Lösung von Cadaverin bewirkt jeder einfallende Tropfen die Abscheidung einer käseartigen, weissen Masse, die sich lederartig anfühlt, in den gebräuchlichen Lösungsmitteln unlöslich ist, sich beim Erhitzen von  $200^0$  an schwach gelb färbt, bei  $235^0$  sintert und bei  $251^0$  im geschlossenen Röhrchen geschmolzen ist. Die basische Verbindung hat die Zusammensetzung  $(C_7H_{14}N_2)_x$  und ist in Säuren löslich (Bischoff und Reinfeld).

8. Durch Einwirkung salpetriger Säure auf Cadaverin bildet sich ein Gemisch isomerer Verbindungen von den Formeln  $C_5H_8$ ,  $C_5H_{10}O$  und  $C_5H_{12}O_2$ . Vorherrschend sind in dem Gemisch die Körper mit endständigen Hydroxylen und Doppelbindungen  $CH_3 \cdot CH \cdot CH_2 \cdot CH \cdot CH_2$ ,  $CH_3 \cdot CH_2 \cdot CH \cdot CH_2 \cdot CH_2 \cdot OH$  und  $CH_2(OH) \cdot CH_2 \cdot CH_2 \cdot CH_2 \cdot CH_2 \cdot OH$ ; in geringeren Mengen sind die Verbindungen

$\text{CH}_3 \cdot \text{CH} : \text{CH} \cdot \text{CH} : \text{CH}_2 \cdot \text{CH}_3 \cdot \text{CH} : \text{CH} \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{CH}_2\text{OH}$  und  $\text{CH}_3 \cdot \text{CH}(\text{OH}) \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{OH}$  vorhanden (Demjanow und Dojarenko)<sup>1)</sup>.

9. Bei raschem Erhitzen zerfällt das Chlorhydrat in Salmiak und Piperidin (Ladenburg).

10. Nach Bolland<sup>2)</sup> gibt das Cadaverin folgende mikrochemische Reaktionen: Kaliumwismuthjodid liefert lange (100  $\mu$  Länge, 10  $\mu$  Breite), rote Nadeln. Nie waren Tafeln sichtbar. Die Stäbchen sind oft zusammengewachsen. Gerade Auslöschung. Die Krystalle sind wenig beständig. — Mit Platinchlorid: gelbe Krystalle, 30  $\mu$  Länge, 15  $\mu$  Breite. Gerade Auslöschung. — Mit Platinbromid: rote Krystalle, Grösse bis 30  $\mu$ ; teils gerade, teils schiefe Auslöschung. Auslöschungswinkel 11°; seltene, zweiachsige Achsenbilder. — Mit Platinjodid: braunschwarze Krystalle, oft mit hellerem Rande. — Mit Jod-Jodkalium im Überschuss: braune Stäbchen, 10  $\mu$  Länge, 5  $\mu$  Breite, schwach polarisierend. — Mit Goldchlorid: grosse (bis 500  $\mu$ ), dichroitische, gelbe Platten von rhombischem, sechseckigem und trapezartigem Querschnitt, teils gerade, teils schiefe Auslöschung; Auslöschungswinkel 28°. — Mit Goldbromid: feurigrote Krystalle mit hexagonalem und kubischem Querschnitt. Die Sechsecke sind oft abgerundet, oft liegen sie aufeinander und verbinden sich zu Rosetten. Grösse 50  $\mu$ . Schiefer Winkel der Tafeln 88°. Teils gerade, teils schiefe Auslöschung; Auslöschungswinkel 13°. — Mit Goldjodid: schwarze, reguläre Sechsecke (25  $\mu$ ) neben länglichen, charakteristischen Gebilden bis 500  $\mu$  Länge, 50  $\mu$  Breite. — Mit Phosphormolybdän- und Siliciumwolframsäure: mikrokristallinischer, auch amorpher Niederschlag. — Mit Phosphorwolframsäure, Ferrocyankalium und Salzsäure, Uranylacetat: weisser, amorpher Niederschlag. — Mit Magnesiumacetat und Natriumphosphat: schiefe Tafeln neben amorphem Niederschlag. — Mit Palladiumchlorür: brauner amorpher Niederschlag. — Mit Pikrinsäure: gelbe, flache Platten, 500  $\mu$  Länge, 50  $\mu$  Breite, oft verwachsen. Schiefe Auslöschung, Auslöschungswinkel 14°. — Chloranil reagiert mit dem Tartrat nicht; nach Zugabe von Natronlauge scheiden sich grünlichblaue Niederschläge aus, die an den Chloranilblättchen hängen. Durch Zugabe von Alkohol erhält man spitze grüne Nadeln, die ein dickes Netz mit jenen braunen Nadeln geben, welche Natronlauge selbst mit Chloranil erzeugt. — Gerbsäure reagiert nicht.

11. Physiologisches Verhalten: Nach Fütterung von kleineren Mengen des Chlorhydrats an einen Hund (0,5—4 g) erschien nichts von der Base im Harn, nach grösseren Dosen (10 g des Acetats) wurde ein geringer Bruchteil unverändert im Harn gefunden. Die grosse Dose verursachte Erbrechen und Diarrhöe (v. Udránszky und Baumann). Nach Pohl<sup>3)</sup> bewirkt Cadaverin bei Kaninchen eine Hemmung mancher Synthesen im Körper des Kaninchens, namentlich einiger Paarungen mit Glykuronsäure.

B. Darstellung und Nachweis. a) Die Tagesmenge Harn (1500 ccm) wird nach v. Udránszky und Baumann<sup>4)</sup> mit 200 ccm Natronlauge von 10 % und 20—25 ccm Benzoylchlorid so lang ge-

<sup>1)</sup> Demjanow und M. Dojarenko, Bericht d. chem. Gesellsch. **40**. 2589. 1907.

<sup>2)</sup> A. Bolland, Monatsh. d. Chem. **29**. 965. 1908, dort Abbildungen.

<sup>3)</sup> L. v. Udránszky und E. Baumann, Zeitschr. f. physiol. Chem. **15**. 77. 1890. — J. Pohl, Arch. f. exper. Path. u. Pharmak. **41**. 97. 1898.

<sup>4)</sup> L. v. Udránszky und E. Baumann, Zeitschr. f. physiol. Chem. **13**. 564. 1889.

schüttelt, bis der Geruch nach diesem verschwunden ist, wobei ein gelblich weisser Niederschlag von unlöslichen Phosphaten, sowie den Benzoylverbindungen der normalen Kohlenhydrate und des grösseren Teils der Diamine entsteht. Ein anderer, geringerer Teil der Diamine bleibt in der salzhaltigen Flüssigkeit in Lösung. Der Niederschlag wird mit Weingeist digeriert und das bräunliche Filtrat nach dem Verdunsten auf ein kleines Volumen in das etwa 30 fache Volumen kalten Wassers gegossen, worauf sich die Benzoyldiamine in nadelförmigen Krystallen abscheiden. Nach ein- oder mehrtägigem Stehen wird der Niederschlag von der milchig trüben Flüssigkeit abfiltriert und so lange gewaschen, bis das Filtrat ganz klar abläuft. Die Trübung rührt von den Benzoylverbindungen der Kohlenhydrate her. Man löst dann nochmals in Weingeist und fällt wieder durch Wasser.

Um den in Lösung gebliebenen Anteil der Diamine zu gewinnen, säuert man den vom Benzoylniederschlag abfiltrierten Harn mit Schwefelsäure stark an und schüttelt ihn dreimal mit dem gleichen Vol. von gewöhnlichem (alkoholhaltigen) Äther. Dieser löst die durch die Schwefelsäure abgeschiedene Benzoesäure, das Benzoylcystin und die Benzoyldiamine. Von der Lösung wird der Äther abdestilliert, der Rückstand, bevor er erstarrt, in ungefähr soviel 12 %ige Natronlauge eingetragen, als zur Neutralisation erforderlich ist, die Flüssigkeit noch mit dem 3—4fachen Vol. derselben Lauge versetzt und in die Kälte gestellt. Es scheiden sich dann die Natriumverbindungen des Benzoylcystins und die Benzoyldiamine in langen Nadeln und Plättchen ab. Nach 12—24 Stunden saugt man die Mutterlauge von den Krystallen mit der Pumpe ab und wäscht die Krystalle mit wenig kalter Natronlauge. Wasser löst aus dem Gemenge das Benzoylcystin, die zurückbleibenden Benzoyldiamine werden in wenig warmem Weingeist gelöst und aus dieser Lösung durch viel Wasser gefällt.

Liegt ein Gemenge der Benzoylverbindungen beider Diamine vor, worüber der Schmelzpunkt Aufschluss gibt, so löst man die Krystalle in möglichst wenig warmem Weingeist und giesst die Lösung in das 20 fache Volumen Äther, worauf die Benzoylverbindung des Tetramethyldiamins auskrystallisiert, die des Cadaverins in Lösung bleibt. Beim Verdunsten ihrer Lösung krystallisiert auch diese. Durch Umkrystallisieren aus Weingeist erhält man beide Verbindungen rein. Beide Verbindungen lassen sich so fast ohne Verlust trennen.

Die Fällbarkeit der Basen durch Benzoylchlorid ist eine sehr grosse; bei einer Verdünnung von 1 : 10 000 lässt sich das Cadaverin aus wässriger Lösung fast vollständig gewinnen; aus einer Lösung von Putrescin in Harn gleicher Stärke erhielten v. Udránszky und Baumann 60% der Base wieder.

Bei der Benzoylierung des Harns kann sich in kleinen Mengen eine selbst in heissem Alkohol schwer lösliche, in farblosen Nadeln krystallisierende Substanz vom Schmelzpunkt 201—205° bilden (Garrod und



Hurtley), die nach Ellinger u. Riesser<sup>1)</sup> höchstwahrscheinlich mit Tribenzamid identisch ist.

Aus einer wässerigen Lösung der Basen erhält man bei 1 : 10 000 durch Pikrinsäure zwar nach einiger Zeit lange Nadeln der Pikrate, aus Harn aber so wenig, dass sich die Pikrinsäure zum Fälln der Basen aus Harn nicht eignet.

b) Stadthagen und Brieger<sup>2)</sup> haben sich noch eines anderen Verfahrens bedient. Der mit Salzsäure schwach angesäuerte und alsdann eingedampfte Harn wurde wiederholt mit Alkohol extrahiert, der Auszug mit dem gleichen Volumen Wasser verdünnt und mit Quecksilberchlorid und Natriumcarbonat gefällt. Der Niederschlag wurde mit Schwefelwasserstoff zerlegt und die als Chlorid in Lösung befindliche Base mit pikrinsaurem Natron als Pikrat gefällt. Nach Abtrennung des pikrinsauren Kreatinins und Kalis besass das Pikrat den Schmelzpunkt (221°) und die Zusammensetzung des pikrinsauren Cadaverins.

Die Benzoylverbindungen werden als solche aus ihren sich schon bei der Darstellung ergebenden Löslichkeitsverhältnissen, ihren Schmelzpunkten und aus ihrer Zusammensetzung (mindestens Stickstoffbestimmung) erkannt. Liegen die Basen in anderer Form, und nicht in zu geringer Menge vor, so lassen sie sich nach Brieger noch in anderer Weise trennen und kennzeichnen.

Von den Sublimatverbindungen ist die des Putrescins in kaltem Wasser leicht löslich, die des Cadaverins schwer löslich. — Aus heissem 96 %igem Alkohol krystallisiert das salzsaure Putrescin beim Erkalten in Nadeln, während das salzsaure Cadaverin in Lösung bleibt und als Platinsalz weiter gereinigt werden kann. — Das Chloraurat des Putrescins ist ziemlich schwer löslich, das des Cadaverins dagegen leicht.

c) Loewy und Neuberg<sup>3)</sup> isolierten Cadaverin aus dem Harn ihres Cystinurikers nach Verabreichung von Lysin folgendermassen: Der vom ausgeschiedenen Cystin befreite Harn wurde schwach mit Schwefelsäure angesäuert und mit Phosphorwolframsäure ausgefällt. Der ausgewaschene Niederschlag wurde mit Baryt zerlegt; nach Entfernung des Barytüberschusses durch CO<sub>2</sub> wurde eine optisch inaktive, stark alkalische Lösung erhalten. Sie wurde mit Natronlauge versetzt und tropfenweise Phenylcyanat zugegeben. Jeder Tropfen des einfallenden Cyanats hatte unter deutlicher Erwärmung die sofortige Abscheidung eines voluminösen Niederschlages zur Folge. Als sich der Niederschlag auf weiteren Zusatz nicht mehr vermehrte, wurde er abfiltriert. Die weitere Behandlung des Filtrats ergab keine weitere Abscheidung einer Diaminverbindung mehr. Der Niederschlag wurde in Pyridin gelöst, und aus der Lösung durch vorsichtigen Zusatz von Wasser in schneeweissen Krystallen wieder ausgefällt. Nach einmaliger Wiederholung der Umfällung hatten die Krystalle den richtigen Schmelzpunkt.

<sup>1)</sup> A. E. Garrod and W. H. Hurtley, Journ. of physiol. **34**. 221. 1906. — A. Ellinger und O. Riesser, Zeitschr. f. physiol. Chem. **62**. 271. 1909.

<sup>2)</sup> M. Stadthagen und L. Brieger, Berl. klin. Wochenschr. 1889. 345.

<sup>3)</sup> A. Loewy und C. Neuberg, Zeitschr. f. physiol. Chem. **43**. 352. 1904.

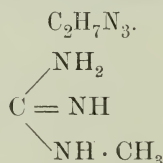


Zur Isolierung von Putrescin aus dem Harn des Cystinurikers, der Arginin erhalten hatte, gingen Loewy und Neuberg genau in der gleichen Weise vor. Nur erfolgte die Reinigung der Phenylcyanat-Verbindung durch Umkrystallisieren aus Pyridin-Alkohol.

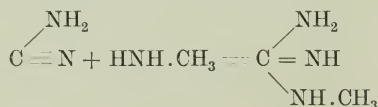
Liegt ein Gemisch von Putrescin und Cadaverin vor, so ist nach Loewy und Neuberg<sup>1)</sup> eine Trennung beider durch die Phenylharnstoffderivate bis zu einem gewissen Grade ebenfalls möglich. Fügt man zu einer nach dem Abkühlen gerade gesättigten Lösung der trocknen Phenylcyanat-Verbindungen in Pyridin wasserfreies Aceton, so fällt momentan das Putrescin-Derivat aus, während die Cadaverinverbindung sich erst bei mehrstündigem Stehen aus dem Filtrat abscheidet. Beide Fraktionen können durch nochmaliges Umkrystallisieren dann gereinigt werden. Von anhaftendem Diphenylharnstoff können die Diamin-Derivate durch Auskochen mit Alkohol befreit werden.

## Basen bekannter Konstitution, die im normalen Harn in geringen Mengen vorkommen.

### I. Methylguanidin.



Synthetisch wurde Methylguanidin von Erlenmeyer durch Erwärmen von Cyanamid mit salzsaurem Methylamin in alkoholischer Lösung erhalten:



Nach M. Schenck<sup>2)</sup> ist das synthetische Produkt identisch mit dem durch Oxydation aus Kreatin (siehe S. 658) erhaltenen und mit der im Fleischextrakt und Harn aufgefundenen Base.

A. Vorkommen. Zuerst hat Achelis aus 30 Liter Harn gesunder Frauen 0,7 g Pikrolonat des Methylguanidins dargestellt; auch aus Hunde- und Pferdeharn isolierte er die gleiche Verbindung. Kutscher und Lohmann, sowie Engeland<sup>3)</sup> erhielten die Base

<sup>1)</sup> A. Loewy und C. Neuberg, Zeitschr. f. physiol. Chem. 43. 356. 1904.

<sup>2)</sup> E. Erlenmeyer, Ber. d. chem. Gesellsch. 3. 896. 1870. — M. Schenck, Arch. f. Pharmacie. 247. 466. 1909.

<sup>3)</sup> W. Achelis, Zeitschr. f. physiol. Chem. 50. 10. 1907. — Kutscher und Lohmann, ebenda 49. 81. 1906. — R. Engeland, ebenda 57. 49. 1908.

ebenfalls aus Menschenharn nach anderen Methoden, Takeda aus dem Harn von Hunden nach Phosphorvergiftung und Kohlrausch nach Angabe von Heyde<sup>1)</sup> aus dem Harn verbrühter Tiere.

Es ist noch nicht klaggestellt, woher das Methylguanidin des Harns stammt. Brieger entdeckte es unter den Fäulnisprodukten des Pferdefleisches, Hoffa fand es im Fleisch von Kaninchen, die mit Reinkulturen von Septikämiebakterien geimpft waren, Kutscher und Gulewitsch stellten es aus Fleischextrakt dar, und Krimberg<sup>2)</sup> zeigte, dass es auch im frischen Muskel fertig gebildet ist.

Da es im Pferdeharn reichlicher als im Menschenharn enthalten ist, so kann es nicht ausschliesslich aus dem Fleisch der Nahrung stammen. Nach Kreatinin-Aufnahme schieden sowohl Menschen als Hunde etwas mehr Methylguanidin aus als ohne Kreatiningaben, aber die Vermehrung betrug nur Centigramme nach Dosen von 16 und 50 g Kreatinin. Nach subkutaner Injektion von Methylguanidin wurden aus dem Harn eines Hundes etwas grössere Mengen eines Pikrolonats, wahrscheinlich eines Gemisches von Methyl- und Dimethylguanidinsalz, erhalten als in der Norm (Achelis). Dorner fand im Kaninchenharn nach subkutaner Injektion nichts von der Base wieder, während Pommerenig<sup>3)</sup> ohne genauere Angaben von unverändertem Übergang in den Harn spricht.

Nach Achelis muss das Methylguanidin „wohl als Vorstufe des beim Eiweissabbau im Körper gebildeten Kreatins aufgefasst werden und leitet sich als solche wahrscheinlich von Guanidin enthaltenden Komponenten des Eiweissmoleküls ab“. Beweise für diese Annahme liegen indessen bisher nicht vor.

B. Eigenschaften. 1. Die freie Base stellt eine stark alkalisch reagierende, zerfliessliche Krystallmasse dar. Das Chlorhydrat krystallisiert im Vacuum zu derben, in Alkohol schwer löslichen Prismen (Brieger). Das Nitrat  $C_2H_7N_3 \cdot HNO_3$  scheidet sich beim Eindampfen der mit Salpetersäure neutralisierten Lösung der Base in Drusen von kleinen und breiten Täfelchen aus. Das in heissem Wasser leicht, in kaltem Wasser und in absolutem Alkohol wenig lösliche Salz schmilzt bei 155° ohne Zersetzung (Kutscher). — Das Pikrat  $C_2H_7N_3 \cdot C_6H_2 \cdot (NO_2)_3 \cdot OH$  krystallisiert aus Wasser in zwei Modifikationen, die beide den Schmelzpunkt 201,5° zeigen: entweder in eigelben, vier-

<sup>1)</sup> K. Takeda, Pflügers Arch. 115. 385. 1910. — M. Heyde, Zentralbl. f. Physiol. 25. 441. 1911.

<sup>2)</sup> L. Brieger, Untersuchungen über Ptomaine III. 33. — Hoffa, Sitzungsber. d. physik.-med. Gesellsch. zu Würzburg 1889. S. 96, zit. nach Jahresb. f. Tierch., 19. 472. — F. Kutscher, Zeitschr. f. Unters. d. Nahrungs- u. Genussm. 10. 528. 1903. — W. Gulewitsch, Zeitschr. f. physiol. Chem. 47. 475. 1906. — R. Krimberg, ebenda 48. 412. 1906.

<sup>3)</sup> G. Dorner, Zeitschr. f. physiol. Chem. 52. 267. 1907. — E. Pommerenig, Hofm. Beitr. 1. 564. 1902.

seltener sechseckigen, langen, sehr schmalen Tafeln, die gewöhnlich nadelförmige Aggregate bilden und Pleiochromismus (lichtgelb und lichtgelblich grün) zeigen, oder in orangefarbenen, kürzeren, viereckigen Tafeln, die lichtgelb oder dunkelgelb erscheinen. Die Modifikationen können beim Umkrystallisieren ineinander übergehen (Gulewitsch). — Das Pikrolonat  $C_2H_7N_3 \cdot C_{10}H_8N_4O_5$  ist in kaltem Wasser sehr schwer (0,025:100), in absolutem Alkohol schwer löslich (0,06:100). Es schmilzt unter Aufschäumen bei ca.  $270^\circ$ , nachdem es bei  $225^\circ$  eine olivgrüne Farbe angenommen hat (Achelis). Wheeler und Jamieson<sup>1)</sup> geben den Schmelzpunkt  $291^\circ$  an und bezeichnen die Krystalle als diamantartige Tafeln oder Blöcke. Ihr Methylguanidin war synthetisch durch Auflösen von bromwasserstoffsäurem Äthylpseudothioharnstoff in 33 % iger Methylaminlösung gewonnen.

Das Chloroplatinat  $(C_2H_7N_3, HCl)_2 PtCl_4$  bildet orangefarbene, tafelförmige Krystalle vom Schmelzpunkt  $194-195^\circ$  (Schenck); Löslichkeit in Wasser 14,3:100. — Das Chloraurat  $C_2H_7N_3 \cdot HCl \cdot AuCl_3$  scheidet sich aus der konzentrierten wässrigen Lösung des Chlorhydrats mit 30 % iger Goldchloridlösung erst ölig, dann in rhombischen Krystallen ab. Aus heisser, verdünnter Salzsäure umkrystallisiert, schmilzt es bei  $198-200^\circ$  (Brieger, Kutscher und Lohmann, Engeland). In reinem Wasser zersetzt es sich beim Erhitzen. Es löst sich leicht in Äther, schwer in Alkohol und in Wasser (Tatarinoff<sup>2)</sup>). — Das Platinsulfocyanat  $(C_2H_7N_3 \cdot CNSH)_2 Pt(CNS)_4$  erhält man durch Übergießen von Nitrat mit einer 4 % igen wässrigen Lösung von Kaliumplatinsulfocyanat momentan krystallinisch. Aus Wasser umkrystallisiert, bildet es rote, glänzende, durchsichtige Säulen, die in kaltem Wasser schwer, in heissem Wasser und in Alkohol leicht löslich sind, beim Trocknen Glanz und Durchsichtigkeit verlieren und bei  $175-180^\circ$  schmelzen (Kutscher).

2. Das Chlorhydrat verbindet sich mit Phosphormolybdänsäure zu einem gelben, krystallinischen Niederschlag, mit Kaliumwismutjodid zu einem ziegelroten Pulver, mit Jodjodkalium und jodhaltiger Jodwasserstoffsäure zu öligen Tropfen. Alkoholisches Quecksilberchlorid fällt das Salz aus seiner konzentrierten Lösung, während wässrige Sublimatlösung keine Fällung hervorruft (Brieger). Gesättigte  $HgCl_2$ - und Natriumacetatlösung fällen ebenfalls (Engeland). Phosphorwolframsäure, Silbernitrat plus Barytwasser schlagen die Base nieder, Silbernitrat plus Ammoniak dagegen und Gerbsäure nicht (Kutscher<sup>3)</sup>, Engeland).

3. Bolland<sup>4)</sup> gibt für eine Lösung von Methylguanidinnitrat mit einem Überschuss von Weinsäure folgende charakteristische, mikrochemische Reaktionen an: Mit Kaliumwismutjodid: anfangs mikrokristallinischer Niederschlag, nachher entstehen besonders am Rande des Tropfens orangefarbene Tafeln, Nadeln bis

<sup>1)</sup> H. L. Wheeler and G. J. Jamieson, Journ. of biol. chem. 4. 115. 1908.

<sup>2)</sup> P. Tatarinoff, Über Methylguanidine verschiedenen Ursprungs. Inaug.-Diss. München 1879.

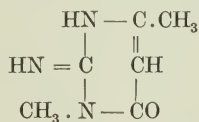
<sup>3)</sup> Kutscher, Zentralbl. f. Physiol. 19. 504. 1905.

<sup>4)</sup> A. Bolland, Monatsh. f. Chem. 29. 965. 1908.

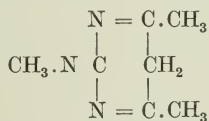
200  $\mu$  Länge, 10  $\mu$  Breite, teils gerade, teils schiefe Auslöschung. — Mit Goldchlorid: gelbe Stäbe, 400  $\mu$  Länge, 15  $\mu$  Breite, schiefe Auslöschung. Auslöschungswinkel 15°. — Mit Goldbromid: braunrote, längliche und quadratische Gebilde, 30  $\mu$ . Die länglichen löschen längs der Prismenkante aus, die quadratischen längs der Diagonale. — Mit Platinchlorid: gelbe, rechtwinklige Tafeln und Prismen, 70  $\mu$  Länge, 10  $\mu$  Breite. — Mit Platinbromid: roter, mikrokristallinischer Niederschlag, Nadeln, gerade Auslöschung. — Mit Pikrinsäure: charakteristische Krystalle (Abbild. im Original), gelblichgrün, bis 500  $\mu$  Länge, 40  $\mu$  Breite; schiefe Auslöschung, Auslöschungswinkel 17°.

4. Erwärmt man 0,9 g Methylguanidinnitrat, in 10 ccm Wasser gelöst, mit 8 ccm 33 % iger Natronlauge und 4 ccm Benzolsulfochlorid unter Umschütteln, so scheiden sich beim Abkühlen Krystalle von Benzolsulfomethylguanidin ab. Aus Wasser umkrystallisiert und mit Alkohol gewaschen, zeigen sie den Schmelzpunkt 184°; Löslichkeit in Wasser 0,04:100 (Ackermann)<sup>1)</sup>. Die Reaktion kann zur Unterscheidung von Kreatinin dienen, das unter diesen Bedingungen keine schwer lösliche Verbindung bildet.

5. Äquivalente Mengen Methylguanidincarbonat und Acetessigester, mit dem dreifachen Gewicht absoluten Alkohols verdünnt, geben am Rückflusskühler im Paraffinbad auf 105–110° drei Stunden erhitzt, unter allmählicher CO<sub>2</sub>-Abgabe weisse Krystalle von anderer Form als das Carbonat: Dimethylimidouracil



Aus heissem Wasser umkrystallisiert, schmilzt die Verbindung bei 312°, sie ist in den organischen Solventien unlöslich, in Säuren löslich, aus der Säurelösung durch Ammoniak fällbar, aber auch in starkem Alkali löslich. Behandelt man in der gleichen Weise Methylguanidincarbonat mit Acetylaceton und dampft nach einstündigem Erhitzen den grössten Teil des Alkohols ab, so scheiden sich glänzende lange Prismen von Acetylacetonmethylguanidin



ab, die nach Umkrystallisieren aus Petroläther bei 98° schmelzen. Sie riechen eigentümlich, sind sublimierbar und sehr beständig gegen konzentrierte Kalilauge (Majima<sup>2)</sup>).

6. Physiologisches Verhalten. Die Base ist giftig. 0,01 g des schwefelsauren Salzes bewirkt beim Frosch charakteristische, fibrilläre Muskelzuckungen (Gergens und Baumann)<sup>3)</sup>. Über Wirkungen auf Säugetiere siehe bei Brieger und Heyde, der ein dem anaphylaktischen Shock ähnliches Vergiftungsbild bei Meerschweinchen sah.

<sup>1)</sup> D. Ackermann, Zeitschr. f. physiol. Chem. 48. 382. 1906.

<sup>2)</sup> R. Majima, Ber. d. chem. Gesellsch. 41. 176. 1908.

<sup>3)</sup> E. Gergens und E. Baumann, Pflügers Arch. 12. 205. 1876.



C. Darstellung und Nachweis. 1. Achelis<sup>1)</sup> benutzte zur Isolierung folgendes Verfahren, das sich an das Vorgehen von Kutscher und Lohmann anschliesst. Der Harn wurde möglichst frisch durch Kieselgur filtriert, mit Salzsäure stark angesäuert und mit Phosphorwolframsäure ausgefällt. Der Niederschlag wurde abgesaugt, mit 5%iger Schwefelsäure gut ausgewaschen und mit heissgesättigtem Barytwasser zersetzt. Der Überschuss von Baryt wurde durch Kohlensäure gebunden. Das Filtrat von Baryumcarbonat, das die kohlensauen Basen enthielt, wurde auf dem Wasserbade bis auf etwa 300 ccm eingedampft, mit Salpetersäure schwach angesäuert und mit einer 20 % igen Silbernitratlösung versetzt. Von den dadurch ausgefällten Alloxurbasen wurde abgesaugt und zu dem Filtrat so lange Silbernitrat hinzugegeben, bis es, gegen Barytwasser geprüft, sofort einen braunen Niederschlag hervorrief. Sodann wurde unter Kontrolle von ammoniakalischer Silbernitratlösung (s. unter B. 2.) mit kaltgesättigtem Barytwasser zunächst das Kreatinin als Silberverbindung ausgefällt, d. h. mit dem Zusatz von Barytwasser wurde so lange fortgefahren, bis ein Tropfen der gefällten Flüssigkeit, mit einem Tropfen der ammoniakalischen Silberlösung zusammengebracht, an der Berührungsstelle nur eine schwache Trübung erkennen liess. (Die ammoniakalische Silberlösung wird bereitet, indem man 2—3 ccm 10 % iger Silbernitratlösung mit Ammoniak versetzt, bis das ausfallende Silberoxyd sich eben wieder löst, und dann 1—2 Tropfen 10 % iger Ammoniaklösung zufügt.) Das Filtrat von dem ersten Silber-Barytniederschlag wurde so lange mit Baryt versetzt, bis keine weitere Fällung mehr eintrat. Der Niederschlag wurde abgesaugt, mehrfach mit Wasser ausgewaschen, sodann mit Wasser verrieben, mit Schwefelsäure angesäuert und mit Schwefelwasserstoff zersetzt. Das Filtrat vom Schwefelsilber wurde auf dem Wasserbade vom Schwefelwasserstoff befreit, die Schwefelsäure durch Zugabe von Barytwasser gebunden und der Barytüberschuss durch Kohlensäure ausgefällt und abgesaugt. Das auf dem Wasserbad stark eingeeengte Filtrat wurde mit verdünnter Schwefelsäure neutralisiert, von noch ausfallenden Spuren von Baryumsulfat filtriert und auf wenige ccm eingedampft. Die Flüssigkeit gab noch schwache Kreatininreaktion.

Um eine Fällung mit Pikrolonsäure zu erhalten, musste die Flüssigkeit nochmals mit Salpetersäure schwach angesäuert und der ganze Gang der Untersuchung mit der fraktionierten Silberfällung noch einmal wiederholt werden. Die nach der zweiten Behandlung erhaltene Lösung gab in der Regel keine deutliche Kreatininreaktion mehr; falls die Reaktion positiv ausfiel, so wurde die Behandlung noch einmal wiederholt.

<sup>1)</sup> W. Achelis, Zeitschr. f. physiol. Chem. 50. 10. 1906.

Die so erhaltene Lösung wurde mit gesättigter, wässriger Pikrolonsäurelösung gefällt. Der gelbe, krystallinische Niederschlag wurde scharf abgesaugt, aus kochendem Wasser umkrystallisiert und durch Waschen mit wenig Wasser und Alkohol gereinigt.

30 Liter Frauenharn lieferten 0,7 g Pikrolonat, 14 Liter Menschenharn nach rein vegetarischer Kost 0,347 g, 11 Liter Hundeharn bei ebensolcher Nahrung 0,122 g, 10 Liter Pferdeharn 0,533 g.

2. Kutscher und Lohmann<sup>1)</sup> erhielten das Chloraurat des Methylguanidins aus den Mutterlaugen des Pyridinmethylchlorids und des Gynesins (s. u.), bezw. aus den Filtraten von ihren Chloroplatinaten.

3. Engeland<sup>2)</sup> isolierte das Chloraurat wie folgt:

Etwa 28 Liter Harn wurden auf freiem Feuer auf  $\frac{1}{3}$  des Volums eingedampft. Dann wurde bei ganz schwach saurer Reaktion mit 20 %iger Tanninlösung ausgefällt. Von dem gut abgesetzten Niederschlag wurde die klare Flüssigkeit dekantiert und mit Barytwasser vom überschüssigen Tannin, mit Schwefelsäure vom Baryt und mit Bleioxyd von der Schwefelsäure sowie den Resten des Tannins befreit. Die resultierende, dunkel gefärbte Flüssigkeit wurde mit heisser gesättigter Quecksilberchlorid- und Natriumacetatlösung ausgefällt. (Eine Probe des Filtrats darf mit einem Überschuss von kaltgesättigter Sublimatlösung auch nach längerem Stehen keinen Niederschlag mehr absetzen.) Nach einigem Stehen wurde die Fällung abgesaugt und mit kaltgesättigter Sublimat- und Natriumacetatlösung gewaschen. Dann wurde der Niederschlag mit heisser, verdünnter Salzsäure digeriert, vom Unlöslichen dekantiert und schliesslich abgesaugt. Das Filtrat wurde durch Einleiten von Schwefelwasserstoff vom Quecksilber befreit. Das Filtrat vom Schwefelquecksilber wurde auf dem Wasserbade eingedampft und der Rückstand mit Methylalkohol aufgenommen. Hierbei bleiben die anorganischen Beimengungen ungelöst zurück. Von ihnen wurde abfiltriert, das Filtrat eingedampft, der Rückstand mit heissem Wasser aufgenommen und durch Kochen mit reiner, mit verdünnter Salzsäure ausgekochter Tierkohle (Merck) energisch entfärbt. Die geklärte Flüssigkeit wurde zum Sirup eingeeengt und mit Äthylalkohol aufgenommen, hierbei bleiben Ammonium- und Kreatininchlorid ungelöst zurück. Von ihnen wurde abfiltriert und das Filtrat aufs neue zum Sirup eingeeengt und mit absolutem Alkohol aufgenommen.

Dieses Verfahren wurde so lange wiederholt, bis eine in kaltem absolutem Alkohol leicht lösliche Masse resultierte. Dann wurde die konzentrierte wässrige Lösung mit 30%iger Goldchloridlösung versetzt. Die reichliche krystallinische Fällung wurde abgesaugt, aus heisser verdünnter Salzsäure umkrystallisiert. Sie bestand aus reinem Chloraurat des Methylguanidins; Ausbeute: 2,1 g.

Die Methode scheint von den bisher angewandten die einfachste zur Isolierung der Base aus dem Harn zu sein. Durch Kontrollversuche überzeugte sich Engeland, dass bei dem angewandten Verfahren aus Kreatinin kein Methylguanidin gebildet wird.

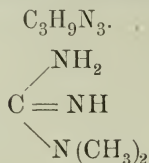
Zur Identifizierung des Methylguanidins kann ausser den Schmelzpunkten des Goldsalzes, des Pikrats und des Pikrolonats und den mikrochemischen Reaktionen auch die Darstellung der Benzolsulfoverbindung, vielleicht auch eine der sub B. 5. angeführten Reaktionen dienen.

<sup>1)</sup> Kutscher und Lohmann, Zeitschr. f. physiol. Chem. 49. 81. 1906.

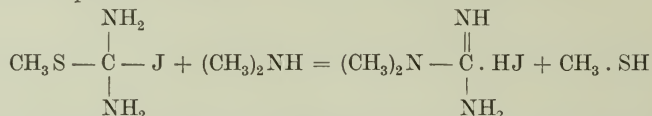
<sup>2)</sup> R. Engeland, Ztschr. f. physiol. Chem. 57. 52. 1908.



## II. Dimethylguanidin.



Das Jodmethylat der Base wurde synthetisch von Wheeler und Jamieson durch Einwirkung von Dimethylamin in 33%iger Lösung auf das Additionsprodukt aus Thioharnstoff und Jodmethyl (2-Methylpseudothioharnstoff-Jodhydrat) bei Zimmertemperatur erhalten.



Das Pikrolonat dieses asymmetrischen 2,2-Dimethylguanidins erwies sich identisch mit dem zwei Jahre vorher aus dem Harn dargestellten. Vor dieser Identifizierung hatten Kutscher und Lohmann die Konstitution richtig aus dem Umstand erschlossen, dass ihre Base von dem symmetrischen 1,2-Dimethylguanidin Schencks<sup>1)</sup> verschieden war.

A. Vorkommen. Nachdem Kutscher und Lohmann im Harn von Hunden, welche Fleischextrakt erhielten, Dimethylguanidin aufgefunden hatten, isolierte es Engeland auch aus normalem Menschenharn. Derselbe<sup>2)</sup> fand es auch im Harn eines Hundes, dem salzsaures Carnitin injiziert war.

B. Eigenschaften. Von der Base sind bisher nur folgende Salze beschrieben: 1. Das Pikrat  $\text{C}_3\text{H}_9\text{N}_3$ ,  $\text{C}_6\text{H}_3\text{O}_7\text{N}_3$ : Die Lösung des Bromhydrats, die durch Auflösen von bromwasserstoffsäurem Äthylpseudothioharnstoff in Dimethylaminlösung gewonnen wird, gibt mit wässriger Pikrinsäure einen krystallinischen Niederschlag, der aus Wasser umkrystallisiert, kleine, spitze, gelbe Prismen vom Schmelzpunkt  $224^\circ$  bildet (Wheeler und Jamieson) bzw.  $230^\circ$  (Schenck). 2. Das Pikrolonat  $\text{C}_3\text{H}_9\text{N}_3$ ,  $\text{C}_{10}\text{H}_8\text{O}_5\text{N}_4$ , analog dargestellt, bildet kleine, flache, vierseitige, gelbe Prismen, die sich unter Aufschäumen scharf bei  $278^\circ$  zersetzen (Wheeler und Jamieson, Kutscher und Lohmann). 3. Das Chloraurat  $\text{C}_3\text{H}_9\text{N}_3 \cdot \text{HAuCl}_4$  bildet, aus heisser konzentrierter Salzsäure umkrystallisiert, bei langsamer Abscheidung grosse, gelbe Tafeln, bei raschem Auskrystallisieren glänzende, schuppenförmige Blättchen. Es schmilzt bei  $244^\circ$  und zersetzt sich etwa bei  $250^\circ$  (Riesser, mündliche Mitteilung). Die Angabe Engelands,

<sup>1)</sup> H. L. Wheeler and G. S. Jamieson, Journ. of biol. chem. **4**. 111. 1908. — M. Schenck, Zeitschr. f. physiol. Chem. **77**. 347. 1912. — Kutscher und Lohmann, Zeitschr. f. physiol. Chem. **48**. 422. 1906. — M. Schenck, Arch. der Pharmacie **247**. 466. 1909.

<sup>2)</sup> R. Engeland, Zeitschr. f. physiol. Chem. **57**. 49. 1908. — Derselbe, Zeitschr. f. Unters. d. Nahrungs- u. Genussm. **16**. 664. 1908.

der Schmelzpunkt liege bei 144<sup>o</sup>, beruht vielleicht auf einem Druckfehler. 4. Das Platinsalz  $(C_3H_9N_3)_2H_2PtCl_6$  bildet Nadeln vom Zersetzungspunkt 225<sup>o</sup> (Schenck).

C. Darstellung. 1. Engeland versetzte 24 Liter Menschenharn mit einer kaltgesättigten Lösung von Quecksilberchlorid und Natriumacetat solange, als auf Zusatz unmittelbar ein Niederschlag entstand. Nach mehrtägigem Stehen wurde der Niederschlag abgesaugt und mit dem Gemisch der Fällungsmittel gut gewaschen, in heisse, verdünnte Salzsäure gebracht und längere Zeit auf dem Wasserbade digeriert. Hierbei ging der grösste Teil mit dunkelbrauner Farbe in Lösung, während sich das Unlösliche klar absetzte. Von diesem wurde dekantiert und schliesslich abgesaugt. Das Filtrat wurde mit Schwefelwasserstoff vom Quecksilber befreit und das Filtrat vom Schwefelquecksilber auf dem Wasserbad bis zur beginnenden Krystallisation eingengt. Der beim Erkalten krystallinisch erstarrte Rückstand wurde mit Methylalkohol und absolutem Äthylalkohol zur Abtrennung der anorganischen Salze und eines Teils des Kreatininchlorhydrats behandelt, wie S. 699 beschrieben. Der in wenig Alkohol aufgenommene Sirup wurde mit alkoholischer Platinchloridlösung ausgefällt. (Der Niederschlag wurde abgesaugt, mit absolutem Alkohol gewaschen, in heissem Wasser gelöst und mit Schwefelwasserstoff vom Platin befreit. Das Filtrat vom Platinsulfid wurde zum dünnen Sirup eingengt und mit 30 % iger wässriger Goldchloridlösung das Chloraurat des Kreatinins ausgefällt.) Das Filtrat der Platinfällung wurde abgedampft, mit heissem Wasser aufgenommen und mit Schwefelwasserstoff vom Platin befreit. Das Filtrat vom Platinsulfid wurde zum Sirup eingengt und mit 30 % iger Goldchloridlösung versetzt. Nach längerem Stehen krystallisierte das Chloraurat des Dimethylguanidins aus, das aus heisser verdünnter Salzsäure umkrystallisiert wurde.

Auch aus 2 Liter Hundeharn isolierte Engeland nach der gleichen Methode 0,15 g des Chloraurats.

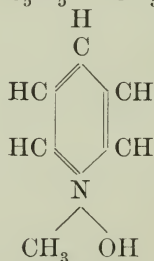
2. Kutscher und Lohmann fanden das Dimethylguanidin bei der Verarbeitung des Harns von Hunden, die Fleischextrakt erhalten hatten, in der zweiten Silberfällung (Kreatininfraktion, siehe S. 698), die sie durch Zusatz von Silbernitrat und Barytwasser unter Vermeidung eines Baryt-Überschusses erhalten hatten. Diese Silberfällung wurde in folgender Weise fraktioniert: Sie wurde, in Wasser aufgeschwemmt, mit Schwefelwasserstoff zersetzt. Das Filtrat vom Schwefelsilber wurde stark eingengt, mit Salpetersäure schwach angesäuert und das Kreatinin durch Silbernitrat und Barytwasser unter Kontrolle von ammoniakalischer Silberlösung der Hauptsache nach abgeschieden. Das Filtrat vom Kreatininsilber wurde nach Zugabe von etwas Silbernitrat mit Barythydrat gesättigt. Der neue Niederschlag wurde mit Schwefelwasserstoff zersetzt, das Filtrat vom Schwefelsilber, das noch Kreatininreaktion gab, zum dünnen Sirup eingengt, in wenig Wasser gelöst, mit Schwefelsäure neutralisiert und mit gesättigter, wässriger Pikrolonsäure gefällt. Das Pikrolonat wurde aus heissem Wasser umkrystallisiert.

Kutscher und Lohmann sowohl wie Engeland<sup>1)</sup> fanden unter den nach verschiedener Vorbehandlung des Harns gewonnenen Goldsalzen auch eines aus Menschenharn, das sie als Chloraurat des Vitiatins bezeichnen. Vitiatin nennen die Autoren eine zweisäurige Base der Formel  $C_5H_{14}N_6$ , die Kutscher auch im Fleischextrakt gefunden hat.

Die Einheitlichkeit dieser Base scheint mir nicht genügend gesichert. Denn sie ist nur als Goldsalz isoliert. Das Goldsalz aber zeigt keinen scharfen Schmelzpunkt; es schmilzt vielmehr unscharf bei  $167^{\circ}$ , bei  $190^{\circ}$  erst wird die Schmelze klar. Die Analysenzahlen würden sich ebensogut erklären lassen, wenn ein Gemenge von Chlorauraten des Methyl- und Dimethylguanidins vorlägen. Dieser Verdacht findet eine weitere Stütze darin, dass bei der Aufarbeitung der Harne, die das Vitiatin liefern, niemals gleichzeitig Mono- und Dimethylguanidin, sondern nur Monomethylguanidin gefunden wurde, obwohl der normale Harn nach den Feststellungen derselben Autoren beide Homologe enthält.

Über die Isolierung eines Goldsalzes von Cholin (?) aus dem Harn eines Kranken mit Morbus Addisonii durch Marino-Zucco und Dutto s. S. 739.

### III. Pyridylmethylanmoniumhydroxyd.



Syn.: Methylpyridiniumhydroxyd, Pyridinmethylumhydrat.

Das Chlorid der Base entsteht nach Ostermayer durch Erhitzen von mit Salzsäuregas gesättigtem Pyridin mit Methylalkohol auf  $230^{\circ}$ .

$C_5H_5N \cdot HCl + CH_3 \cdot OH = C_5H_5N \cdot CH_3Cl + H_2O$   
oder durch Umsetzung von Pyridinjodmethyleat mit Chlorsilber (Bally<sup>2)</sup>).

A. Vorkommen. Die Base wurde von His aus dem Harn von Hunden, die essigsäures Pyridin per os erhalten hatten, als Chloro-

<sup>1)</sup> Kutscher und Lohmann, Zeitschr. f. physiol. Chem. 51. 462. 1907. — Engeland, a. a. O. S. 56.

<sup>2)</sup> E. Ostermayer, Ber. d. chem. Gesellsch. 18. 591. 1885. — O. Bally, ebenda 21. 1772. 1888.

platinat isoliert. R. Cohn sowie Abderhalden, Brahm und Schittenhelm haben später diesen Befund für Hunde bestätigt, und die letzteren fanden, dass Kaninchen nicht imstande sind, das Pyridin zu methylieren. Dagegen wird im Organismus des Huhnes (Hoshiai), des Schweins und der Ziege (Totani u. Hoshiai) das Pyridin methyliert. Im normalen Menschenharn entdeckten Kutscher und Lohmann die Base und erkannten bald ihre Konstitution richtig, nachdem sie dieselbe anfangs für Neurin gehalten hatten, durch Vergleich des Goldsalzes mit dem der synthetisch von Ostermayer erhaltenen Verbindung. Auch im normalen Menschenharn ist die quaternäre Base nach der Ansicht von Kutscher und Lohmann<sup>1)</sup> als Umwandlungsprodukt des Pyridins, das in Genussmitteln, wie dem Kaffee und dem Tabakrauch, aufgenommen wurde, zu betrachten. Für diese Anschauung spricht einmal das Fehlen der Base im normalen Harn von Katzen und Hunden, ferner kommt sie reichlicher im Harn von Frauen (2,6 g Aurochlorat aus 100 Liter) als in dem nicht oder schwach rauchender Männer (0,17 g aus 10 Liter) vor, was auf die grössere Vorliebe der Frauen für den Kaffee zurückgeführt wird.

Die Base ist auch im Krabbenextrakt von Ackermann und Kutscher<sup>2)</sup> gefunden, und soll auch im Kaffeeextrakt vorkommen.

B. Eigenschaften. 1. Die Base selbst ist nicht dargestellt. Ihre wässrige Lösung ist eine leicht zersetzliche, stark alkalische Flüssigkeit, die sich schon beim Eindunsten im Exsiccator unter Bildung roter Schmierer zersetzt (Hantzsch und Kalb)<sup>3)</sup>.

2. Pyridinmethylchlorid  $C_5H_5N \cdot CH_3Cl$  bildet weisse, zerfliessliche Nadeln und liefert gut krystallisierende Salze mit  $AuCl_3$ ,  $PtCl_4$ ,  $HgCl_2$  und  $FeCl_3$ . — Das Pikrat  $C_5H_5N \cdot CH_3 \cdot O \cdot C_6H_2 \cdot (NO_2)_3$  entsteht beim Stehen einer wässrigen Lösung des Chlorids mit überschüssiger, gesättigter Natriumpikratlösung. Es bildet gelbe Nadeln vom Schmelzpunkt  $212^0$ , die aus heissem Wasser umkrystallisiert werden können. 100 Teile Wasser lösen 1,092 bei Zimmertemperatur, 100 Alkohol 0,368, 100 Äther nur 0,017 Teile (Totani u. Hoshiai). — Das Aurochlorat  $C_5H_5N \cdot CH_3Cl \cdot AuCl_3$  schmilzt aus stark salzsäurehaltigem Wasser mehrfach umkrystallisiert, bei  $252^0$  (Ostermayer, Kutscher und Lohmann). Es bildet hellgelbe Nadeln, in kaltem Wasser

<sup>1)</sup> W. His, Arch. f. exper. Pathol. u. Pharmakol. **22**. 253. 1887. — R. Cohn, Ber. d. chem. Gesellsch. **27**. 2906. 1894. — E. Abderhalden, C. Brahm und A. Schittenhelm, Zeitschr. f. physiol. Chem. **59**. 32. 1909. — Z. Hoshiai, Zeitschr. f. physiol. Chem. **62**. 118, 1909. — G. Totani u. Z. Hoshiai, Zeitschr. f. physiol. Chem. **68**. 83. 1910. — Kutscher u. Lohmann, Zeitschr. f. phys. Chem. **48**. 5., **49**. 83. 1906 u. Zeitschr. f. Unters. d. Nahrungs- u. Genussm. **13**. 77. 1907.

<sup>2)</sup> D. Ackermann und F. Kutscher, Zeitschr. f. Unters. d. Nahrungs- u. Genussm. **14**. 687. 1907.

<sup>3)</sup> A. Hantzsch und M. Kalb, Ber. d. chem. Gesellsch. **32**. 3117. 1899.



schwer, in heissem Wasser und Alkohol leicht löslich. — Das Chloroplatinat  $(C_5H_5N \cdot CH_3Cl)_2PtCl_4$  fällt aus der alkoholischen Lösung des Chlorids mit alkoholischer Platinchloridlösung. Nach Waschen mit Alkohol und Umkrystallisieren aus heissem Wasser bildet es breite glänzende, lachsfarbene Blättchen vom Schmelzpunkt  $205^0$  (Kutscher und Lohmann), bzw.  $205-207^0$  (Bally),  $211^0$  (R. Cohn),  $203$  bis  $204^0$  (Zincke u. Würker). — Das Doppelsalz mit Quecksilberchlorid  $C_5H_5N \cdot CH_3Cl \cdot HgCl_2$  bildet, aus heissem Wasser umkrystallisiert, weisse Nadeln, die bei  $189-191^0$  unter Zersetzung schmelzen (Zincke und Würker). — Bringt man zur Lösung des Chlorids in verdünnter Salzsäure einen Überschuss von 20%iger Eisenchloridlösung und gibt so viel rauchende Salzsäure zu, dass eine bleibende Trübung entsteht, so scheidet sich nach einigen Stunden das Eisenchloriddoppelsalz  $C_5H_5N \cdot CH_3Cl \cdot FeCl_3$  in gelben Nadeln aus, die sich im Überschuss des Fällungsmittels lösen. Das Salz wird in wenig Wasser gelöst und nochmals wie beschrieben gefällt und durch Trocknen im Vacuum über Kali von Salzsäure befreit (Scholtz)<sup>1)</sup>. — Die Base fällt ferner mit Kaliumquecksilberjodid (His).

3. Mit Brom versetzt liefert das Chlorid Blättchen der Zusammensetzung  $C_5H_5N \cdot CH_3Br$ ,  $Br_2$ , vom Schmelzpunkt  $82-83^0$  (Trowbridge und Diehl)<sup>2)</sup>, die an der Luft Brom verlieren und beim Erwärmen mit wässriger Pikrinsäure in das Pikrat  $C_5H_5N \cdot CH_3 \cdot O \cdot C_6H_2 \cdot (NO_2)_3 + \frac{1}{2}H_2O$ , lange, dicke, grünlichgelbe Nadeln vom Schmelzpunkt  $34^0$ , übergehen (Ostermayer). Dieses beim Erhitzen stark explosive Salz entsteht auch direkt beim Mischen einer heissen Pikrinsäurelösung mit dem Chlormethylat.

4. Physiologisches Verhalten. Die Base wird von Katzen und Kaninchen unverändert ausgeschieden (Kohlrausch)<sup>3)</sup>. Dosen von 1–1,5 g wirken tödlich.

C. Darstellung. 1. Nach Kutscher und Lohmann werden grössere Mengen Harns (wenigstens 10 Liter) durch mit Kieselgur bedeckte Filter gesaugt, dann stark mit Salzsäure angesäuert und mit Phosphorwolframsäure ausgefällt. Die Fällung wird nach 24 Stunden abgesaugt. Aus ihr werden in der üblichen Weise die kohlen sauren Basen dargestellt, deren Lösung man bei mässiger Temperatur stark einengt. Es krystallisieren Kreatin und Kreatinin aus. Von diesen Körpern saugt

<sup>1)</sup> Bally, a. a. O. — R. Cohn, Zeitschr. f. physiol. Chem. 18. 116. — Th. Zincke und W. Würker, Liebigs Ann. d. Chem. 341. 365. 1905. — M. Scholtz, Arch. der Pharm. 247. 534. 1909.

<sup>2)</sup> P. F. Trowbridge and O. C. Diehl, Journ. of the Amer. Chem. Soc. 19. 558. 1897.

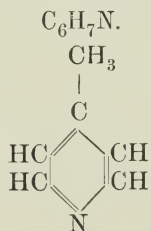
<sup>3)</sup> A. Kohlrausch, Zentralbl. f. Physiol. 23. 143. 1909.

man ab und übersäuert das Filtrat mit Salzsäure. Die Lösung der Chloride wird auf dem Wasserbad zum Sirup eingengt, den man mit Alkohol aufnimmt. Die alkoholische Lösung wird verdunstet, der Rückstand von neuem mit Alkohol aufgenommen und so oft dem gleichen Verfahren unterworfen, bis er sich auch in kaltem absolutem Alkohol des Handels glatt löst. Die alkoholische Lösung wird mit 20 % iger alkoholischer Platinchloridlösung ausgefällt. — Die Platinate werden nach 24—48 Stunden abgesaugt, mit Alkohol gewaschen, in Wasser gelöst und mit Schwefelwasserstoff zersetzt. Die Lösung der Chloride wird zum Sirup eingengt, den man mit absolutem Alkohol aufnimmt. Man fällt die alkoholische Lösung nochmals mit 20 % iger alkoholischer Platinchloridlösung. Die zweite, wesentlich geringere Platinfällung, die völlig oder fast frei von Kreatinin ist, wird wie die erste wieder in die Chloride verwandelt und der Sirup der Chloride mit 30 % iger wässriger Goldchloridlösung ausgefällt. Nach wenigen Tagen saugt man die abgeschiedenen Goldsalze ab und krystallisiert aus siedendem, salzsäurehaltigem Wasser um. Engt man die Lösung bei 70° ein, so scheiden sich schon in der Wärme die in Wasser ausserordentlich schwer löslichen Krystalle des Goldsalzes von Pyridinmethylchlorid ab, die sich leicht von den anderen Auraten trennen und durch Umkrystallisieren aus heissem, salzsäurehaltigem Wasser reinigen lassen.

2. His fällte den Harn der mit Pyridin gefütterten Hunde mit Bleiacetat, dann mit Bleiessig und Ammoniak, entfernte im Filtrat das Blei mit Schwefelsäure und versetzte die vom Blei befreite Lösung mit Kaliumquecksilberjodid. Der dichtflockige, allmählich krystallisierende Niederschlag wurde mit Schwefelsäure und Silberoxyd zersetzt, das Filtrat mit Baryt gefällt und der Barytüberschuss durch Kohlensäure entfernt. Die wässrige, mit Salzsäure neutralisierte Lösung der Base wurde eingedampft, mit Alkohol aufgenommen und als Platinsalz gefällt.

Ähnlich verfahren auch Abderhalden, Brahm und Schittenhelm.

#### IV. 4-Methylpyridin.



Syn.  $\gamma$ -Picolin.

A. Vorkommen. Achelis und Kutscher<sup>1)</sup> isolierten aus Pferdeharn das Goldsalz einer Base, das sie auf Grund der Analysen-

<sup>1)</sup> W. Achelis und F. Kutscher, Zeitschr. f. physiol. Chem. 52. 91. 1907.



resultate und des Schmelzpunktes als  $\gamma$ -Picolin ansprachen. Als Muttersubstanzen betrachten die Autoren Pflanzenalkaloide des Futters, die den Pyridinring enthalten und im Organismus des Pferdes bis zum widerstandsfähigen  $\gamma$ -Picolin abgebaut werden.

B. Eigenschaften.  $\gamma$ -Picolin aus Steinkohlenteer ist eine in Wasser, Alkohol und Äther leicht lösliche Flüssigkeit von charakteristischem Geruch, die bei  $142,5-144,5^{\circ}$  (korr.) siedet. Mit den meisten Säuren bildet sie zerfliessliche, zur Analyse ungeeignete Salze (Ladenburg). — Das Chloroplatinat  $(C_6H_7N, HCl)_2 PtCl_4$ , orangegelbe Blättchen, schmilzt bei  $231^{\circ}$  unter Zersetzung, bzw.  $235-237^{\circ}$  oder  $239-240^{\circ}$ , je nach der Schnelligkeit des Erhitzens (Gabriel und Colman)<sup>1)</sup>, und ist in kaltem Wasser schwer löslich. — Das Chloraurat  $C_6H_7N \cdot HCl \cdot AuCl_3$ , in Wasser sehr schwer löslich, krystallisiert aus heissem Wasser in stark glänzenden Prismen vom Schmelzpunkt  $205^{\circ}$ . Achelis und Kutscher fanden für das Goldsalz aus dem Harn  $201^{\circ}$ . — Das Quecksilber-Doppelsalz  $C_6H_7N, HCl, 2HgCl_2$  krystallisiert in weissen, derben Nadeln vom Schmelzpunkt  $128-129^{\circ}$ , ist in kaltem Wasser schwer, in heissem Wasser und in stark sauren Lösungen leicht löslich. — Das in kaltem Wasser schwer lösliche Pikrat  $C_6H_7N \cdot C_6H_2(NO_2)_3 \cdot OH$  krystallisiert aus heissem Wasser in seidenglänzenden, büschelförmig gruppierten Nadeln. Schmelzpunkt  $167^{\circ}$  (Ladenburg),  $163-164^{\circ}$  (Gabriel und Colman).

C. Darstellung. 10 Liter Pferdeharn wurden bis zur Fällung mit Silbernitrat und Barytwasser so behandelt, wie unter C. 1. bei Methylguanidin beschrieben ist. Die Silberverbindungen wurden abgesaugt, das Filtrat durch Salzsäure vom Silber, durch Schwefelsäure vom Baryt befreit, mit Schwefelsäure stark angesäuert und der Rest der Basen von neuem mit Phosphorwolframsäure gefällt. Aus der Fällung wurden die kohlensauen Basen in der üblichen Weise erhalten, ihre Lösung zur Beseitigung der letzten Reste Baryt stark eingedampft, mit Salzsäure angesäuert und bis zur beginnenden Krystallisation eingengt. Die Chloride wurden so lange mit heissem absolutem Alkohol wiederholt extrahiert und verdampft, bis ein in heissem absolutem Alkohol glatt löslicher Rückstand resultierte. Die alkoholische Lösung dieses Rückstandes wurde mit 20 % iger alkoholischer Platinchloridlösung gefällt. Die Fällung floss allmählich zu einem Sirup zusammen, von dem nach 48 Stunden die Mutterlauge abgegossen wurde. Der Niederschlag wurde nach mehrfachem Waschen mit absolutem Alkohol in der üblichen Weise zersetzt und der Sirup der Chloride mit 30 % iger wässriger Goldchloridlösung gefällt. Die abgeschiedenen Goldverbin-

<sup>1)</sup> A. Ladenburg, Lieb. Ann. d. Chem. **247**. 10. 1888. — S. Gabriel und J. Colman, Ber. d. chem. Gesellsch. **35**. 2850. 1902.

dungen wurden nach mehrtägigem Stehen durch Abgiessen von der Mutterlauge getrennt, in heissem salzsäurehaltigem Wasser gelöst und mit Schwefelwasserstoff zersetzt. Der Sirup der erhaltenen Chloride wurde mit absolutem Alkohol aufgenommen und mit alkoholischer Sublimatlösung gefällt und der Niederschlag mit dem Fällungsmittel gewaschen. Die gefällten Quecksilberverbindungen wurden abermals in die Chloride übergeführt und der Sirup der Chloride zum zweiten Male mit Goldchlorid gefällt. Das nunmehr ausfallende Goldsalz krystallisierte schnell und gab, aus heissem salzsäurehaltigem Wasser zweimal umkrystallisiert, die erwähnten derben, glänzenden Nadeln des Goldsalzes vom Schmelzpunkt  $201^{\circ}$  und der Zusammensetzung  $C_6H_7N \cdot HCl \cdot AuCl_3$ .

## Aus normalem Harn isolierte Basen von unbekannter Konstitution.

### I. Substanz von Baumstark.

Eine dem Allantoin in analytischer Hinsicht sehr ähnliche Verbindung,  $C_3H_8N_2O$ , ist von F. Baumstark<sup>1)</sup> im Harn aufgefunden worden.

A. Vorkommen. In 40 Liter Menschenharn fand sich nur soviel, dass die Anwesenheit der Verbindung dargetan werden konnte; in beträchtlicherer Menge wurde sie bei Ikterus nachgewiesen, unter einer grösseren Reihe von Fällen aber nur einmal. Im normalen Hundeharn wurde sie nicht angetroffen, aber einmal kurze Zeit im Harn eines Hundes, der Benzoëssäure zu seinem Futter erhielt.

B. Eigenschaften. Sie krystallisiert aus Wasser in weissen, der Hippur-säure gleichenden Säulen. Die über Schwefelsäure getrockneten Krystalle dekrepitieren beim Erwärmen, bleiben bis  $250^{\circ}$  unverändert, stossen in höherer Temperatur dicke, weisse Dämpfe von eigentümlichem Geruch aus, schmelzen dann und verbrennen endlich unter dem Geruch nach verbranntem Horn.

Die Substanz löst sich ziemlich leicht in heissem Wasser, schwer in kaltem Wasser und in Weingeist, nicht in absolutem Alkohol oder Äther; die Lösungen reagieren neutral.

Sie bildet mit Säuren leicht lösliche Salze. Die Verbindung mit Salzsäure,  $C_3H_8N_2O \cdot HCl$ , krystallisiert schwer in dendritenförmigen Massen, ist zerfliesslich und löst sich in Weingeist. Mit Basen verbindet sich die Substanz nicht, ihre wässrige Lösung gibt aber mit salpetersaurem Quecksilberoxyd einen Niederschlag.

Beim Erhitzen im Glasrohr entwickelt die Substanz ein brennbares, nach Äthylamin riechendes Gas, ebenso beim Erhitzen mit Natronkalk. Beim Kochen mit Barytwasser gibt sie zuerst die Hälfte ihres Stickstoffs als Ammoniak ab, dann den Rest als Äthylamin; zurück bleibt kohlen-saurer Baryt.

Bei der Behandlung des Körpers mit salpetriger Säure liefert er Fleischmilchsäure.

C. Darstellung. Die Substanz wurde nach folgendem Verfahren gewonnen. Der Harn wurde zum dicken Sirup verdunstet, noch warm mit absolutem Alkohol ausgefällt, vom Filtrat der Alkohol vollständig abdestilliert und der Destillationsrückstand durch starkes Ansäuern mit Salzsäure und Schütteln mit Äther von

<sup>1)</sup> F. Baumstark, Ber. d. chem. Gesellsch. 6. 883 und 1378; Ann. d. Chem. 173. 342. 1874.

der Hippursäure befreit. Darauf wurde die rückständige Flüssigkeit mit Ammoniak übersättigt, mit Bleiessig vollständig ausgefällt, das Filtrat mit Schwefelwasserstoff behandelt und zum dicken Sirup eingedampft. Es krystallisierte dann der Harnstoff mit der Substanz aus. Die Krystallmasse wurde mit soviel starkem Alkohol versetzt, dass eine leicht filtrierende Harnstofflösung entstand, diese Lösung abfiltriert, die rückständigen Krystalle mit Alkohol gut ausgewaschen und unter Zusatz von etwas Tierkohle aus heissem Wasser krystallisiert.

## II. Substanz von Meissner.

G. Meissner <sup>1)</sup> fand im Harn von Hunden, welche mit Brot gefüttert wurden, bei Abwesenheit von Harnsäure neben reichlich ausgeschiedenem Allantoin noch einen besonderen Körper.

Derselbe schied sich bei der Verarbeitung des Harns nach der von Meissner angegebenen Methode der Allantoin Darstellung aus dem Alkoholextrakt auf Zusatz von Äther zugleich mit dem Allantoin in schönen farblosen Warzen von seiden-glänzenden Krystallnadeln (vierseitigen Prismen) aus. Er löste sich leicht in Wasser, löste sich auch in siedendem Alkohol und schied sich beim Stehen der Lösung wieder aus. Die wässrige Lösung des aus Alkohol umkrystallisierten Körpers reagierte neutral. Er löste sich in verdünnter Salzsäure, sowie in verdünnter kalter Salpetersäure und krystallisierte aus diesen Lösungen wieder unverändert aus.

Die Substanz war stickstoffreich, aber frei von Schwefel, schmolz bei ungefähr 150° zu einer gelben Flüssigkeit, welche bei 105–106° wieder zu den ursprünglichen Krystallen erstarrte. Bei 200° entwickelte die geschmolzene Masse Gasbläschen unter Verbreitung eines intensiven Geruchs nach Hundeharn, bei weiterem Erhitzen schwärzte sich der Rückstand, stiess dicke, weisse Nebel aus und verbrannte endlich schnell ohne Asche.

Wurde die Substanz mit Salpetersäure erhitzt, so zersetzte sie sich unter Gasentwicklung und hinterliess dann ein in Blätterbüscheln krystallisierendes Produkt. — Beim Kochen des Körpers mit Barytwasser bildete sich kohlensaurer Baryt und, wie es schien, eine Säure.

## III. Verbindung von Pouchet.

Pouchet <sup>2)</sup> hat zuerst aus dem normalen Harn eine krystallinische Verbindung der Formel  $C_7H_{12}N_4O_2$  oder  $C_7H_{14}N_4O_2$  isoliert.

Die bei der Verarbeitung des Harns auf die Xanthinbasen bleibende Mutterlauge, aus welcher durch ammoniakalische Silberlösung das Carnin gefällt worden war, wurde auf dem Wasserbade vom Ammoniak befreit und in Wasserbadwärme mit Schwefelwasserstoff behandelt. Das Filtrat wurde auf dem Wasserbad zum Sirup verdunstet, dann zwei oder dreimal mit Alkohol und etwas Schwefelsäure eingedampft, um alle Salze in Sulfate überzuführen und zugleich die flüchtigen Säuren (Salzsäure, Essigsäure) als Ester zu entfernen. Die wieder zum Sirup eingedampfte Flüssigkeit wurde darauf mit 15–20 Vol. 95%igem Alkohol versetzt; der entstehende Niederschlag enthält alle Salze neben etwas Kreatin und Kreatinin und manchmal auch Tyrosin. Bei dem Versuch, der Salzmasse das Kreatin und Kreatinin durch siedenden 50%igen Alkohol zu entziehen, wurde auch ein Alkaloid in kleiner Menge gewonnen.

Das Alkaloid krystallisiert im Vacuum langsam in dünnen, sehr zerfliesslichen Nadeln, löst sich wenig in Alkohol, nicht in Äther, reagiert schwach alkalisch und gibt mit Säuren krystallisierende Salze. Das Chlorhydrat bildet konzentrisch gruppierte Nadeln und gibt mit Platinchlorid, Goldechlorid und Quecksilberchlorid

<sup>1)</sup> G. Meissner, Zeitschr. f. rat. Med. (3) 31. 317.

<sup>2)</sup> A. Gabr. Pouchet, Contrib. à la conn. des mat. extract. de l'urine. Paris 1880. S. 19.



zerfliessliche, aber in Alkohol und Äther unlösliche Verbindungen. Das Chlorid gibt ferner mit Nessler'schem Reagens einen gelblich weissen Niederschlag, reduziert aber das Reagens nicht und unterscheidet sich so vom Kreatinin; es liefert ferner mit Jodjodkalium einen braungelben Niederschlag. — Das Chloroplatinat besteht aus goldgelben, orthorhombischen Prismen. — Das Chloraurat krystallisiert in kanariengelben, langen Nadeln und löst sich sehr leicht in Wasser.

Gautier<sup>1)</sup> fügt dieser Beschreibung der Basis hinzu, dass sie eine Mischung von Eisenchlorid und Ferricyankalium sehr schnell blau färbt (Bouchardatsche Reaktion), und dass sie giftig ist.

In der Fortsetzung dieser Untersuchungen ist es Pouchet<sup>2)</sup> gelungen, von zwei aus normalem Harn gewonnenen Basen die Zusammensetzung zu ermitteln.

Er fällte die Basen mit Tannin im Überschuss aus schwach alkalischer Lösung und zerlegte die Niederschläge mit Bleihydrat in Gegenwart erst von starkem, dann von schwachem Alkohol. Die alkoholischen Lösungen lieferten einen Sirup, der durch Dialyse in einen schwer dialysierbaren, flüssigen und in einen krystallinischen Substanzen enthaltenden Anteil zerlegt wurde.

Der flüssige Anteil ist syrupös, krystallisiert selbst bei langem Verweilen im trockenen Vakuum nicht, reagiert neutral, gibt mit den allgemeinen Alkaloidreagentien Niederschläge, verändert sich ziemlich leicht an der Luft, wird durch Salzsäure verharzt und durch Platinchlorid schnell oxydiert. Er besitzt immer die Zusammensetzung  $C_3H_5NO_2$ .

Aus dem leicht dialysierbaren Teil wurde eine Substanz isoliert, welche in spindelförmigen, zu Kugeln geordneten Nadeln krystallisiert, sich in schwachem Alkohol löst, in starkem Alkohol fast unlöslich, in Äther ganz unlöslich ist, schwach alkalisch reagiert und mit Säuren Salze bildet. Das Chloroplatinat krystallisiert in goldgelben, orthorhombischen, zerfliesslichen Prismen. Der Basis selbst kommt die Formel  $C_7H_{12}N_4O_2$  oder  $C_7H_{14}N_4O_2$  zu.

Diese Stoffe sind für Frösche sehr giftig, sie bewirken Paralyse, Aufhebung der Reflextätigkeit und Herzstillstand in Systole. Pouchet hält es für wahrscheinlich, dass die im normalen Harn (in den Fäces und in den Exkreten überhaupt) vorkommenden alkaloidartigen Körper mit den bei der Fäulnis unter Luftabschluss aus Eiweisskörpern entstehenden identisch oder doch nahe verwandt sind.

#### IV. Die Base $C_7H_{15}NO_2$ (bezw. $C_7H_{17}NO_2$ ) (Dombrowski und Kutscher und Lohmann).

Dombrowski beschreibt kurz eine Base aus dem Harn, deren Chlorhydrat in Alkohol löslich ist und mit Platinchlorid ein in kaltem Wasser ziemlich leicht lösliches Salz gibt. Die Base hat nach der Analyse des Platinsalzes die Zusammensetzung  $C_7H_{15}NO_2$ . Sie kommt in der betreffenden Fraktion mit einer anderen, unaufgeklärten Base gemischt vor. Die Chloroplatinate werden durch fraktionierte Krystallisation getrennt; das leichter lösliche Platinsalz der Base  $C_7H_{15}NO_2$  scheidet sich in farnkrautähnlichen Krystallen aus. Eine Base der gleichen Zusammensetzung haben E. und H. Salkowski als Platinsalz unter den Fäulnisprodukten von Fleisch und Fibrin gefunden, und

<sup>1)</sup> A. Gautier, Journ. de l'anat. et de la physiol. 1881. 330; Virchow-Hirsch's Jahresber. 1881. I. 126.

<sup>2)</sup> Pouchet, Comptes rendus 97. 1560. 1883.

eine vielleicht um zwei Wasserstoffatome reichere, vielleicht aber gleich zusammengesetzte Base hat Brieger<sup>1)</sup> ebenfalls aus faulem Fleisch als Goldsalz isoliert. Ob die Base von Dombrowski mit dem von Takeda aus dem Harn mit Phosphor vergifteter Hunde isolierten  $\gamma$ -n-Butyrobetain (siehe dieses) identisch ist, lässt sich bei den wenigen Angaben, die Dombrowski über seine Verbindung macht, nicht entscheiden.

Die recht komplizierte Isolierungsmethode Dombrowskis war die folgende: 100 Liter normalen Harns werden mit Kaliumcarbonat neutralisiert und mit Bleiacetat gefällt. Das Filtrat wird mit Kaliumcarbonat von Blei befreit, neutralisiert, im Vacuum eingengt und der Rückstand mit Alkohol von 80° in der Kälte aufgenommen. Vom Rückstand (A) wird die Lösung (B) abfiltriert. — Die alkoholische Lösung (B) wird im Vacuum destilliert; der Destillationsrückstand wird mit Wasser aufgenommen und mit Schwefelsäure versetzt, um die gebildeten Acetate in Sulfate umzuwandeln. Die filtrierte Flüssigkeit wird im Vacuum eingedampft und der Rückstand wieder mit Alkohol von 80° in der Kälte erschöpfend ausgezogen. Die alkoholische Lösung wird im Vacuum eingengt, und zur Entfernung der Hauptmenge Harnstoff lässt man sie mehrmals erstarren (congeler). Die Mutterlaugen vom Harnstoff versetzt man in wässriger Lösung mit neutralem Quecksilberacetat bei Gegenwart von Kaliumcarbonat, bis der Niederschlag einen gelben Farbenton annimmt. Im Filtrat entfernt man das Quecksilber durch Schwefelwasserstoff, wandelt die Acetate wieder in Sulfate um und konzentriert im Vacuum, um die Essigsäure zu verjagen. Das Konzentrationsprodukt wird wieder wie oben mit Alkohol extrahiert und die alkoholische Lösung im Vacuum zum dünnen Sirup eingengt (Alkoholextrakt C), der in Wasser gelöst und mit Barytwasser gefällt wird. Das alkalisch reagierende Filtrat zeigt einen faden Geruch nach Aminen. Es wird im Vacuum bei niedriger Temperatur zur Sirupkonsistenz eingedampft. Der barythaltige Sirup wird mit viel Alkohol von 95° durchgeknetet, wobei ein pechartiger Rückstand ( $\beta$ ) zurückbleibt. Der in Alkohol lösliche Anteil ( $\alpha$ ), sowie der Rückstand ( $\beta$ ) werden mit Schwefelsäure vom Baryt befreit und mehrere Tage, gegen Fäulnis geschützt, dialysiert. Die vereinigten Dialysate werden im Vacuum bis zu beginnender Krystallisation konzentriert. Man trennt die Krystalle von der syrupösen Mutterlauge und teilt diese durch Behandeln mit kaltem absolutem Alkohol in einen alkohollöslichen Teil  $\alpha\alpha$  und einen unlöslichen  $\alpha\beta$ .

Der lösliche Teil  $\alpha\alpha$  wird konzentriert und der Krystallisation überlassen. Von einem aus Mannit bestehenden krystallinischen Niederschlag wird abgetrennt und der Syrup mit einem geringen Überschuss von Kupfercarbonat bei 60–70° digeriert. Man filtriert warm, konzentriert das Filtrat im Vacuum und scheidet durch Behandeln mit absolutem Alkohol einen flockigen Niederschlag ab, der abzentrifugiert wird. Der alkohollösliche Teil ( $\alpha\alpha$ — $\alpha$ ), der Alkaloide, Phenole und reduzierende Substanzen enthält, wird vom Kupfer befreit, zum Syrup eingengt und mit Barythydrat alkalisch gemacht. Die freigemachten Basen sind zum Teil in Äther, der wenig Alkohol enthält, zum Teil in Alkohol löslich und werden so getrennt. Aus der ätherischen Lösung werden Platinsalze gefällt, die durch fraktionierte Krystallisation getrennt werden. Der grössere Teil besteht aus dem Chloroplatinat des Cadaverins (s. S. 688). Das alkoholische Extrakt wird, da es noch Phenole enthält, mit Phosphormolybdänsäure gefällt. Aus dem Niederschlag werden in der üblichen Weise die Basen bezw. ihre Carbonate erhalten. Die konzentrierte Lösung wird mit Alkohol extrahiert, die Basen

<sup>1)</sup> St. Dombrowski, Arch. Polon. de biol. et d. med. 1893; auch Compt. rend. Acad. d. Scienc. 135. 182 u. 244. 1902. — E. und H. Salkowski, Berichte d. chem. Gesellsch. 16. 1192. 1883. — L. Brieger, Über Ptomaine III. 27. Berlin 1886.



in die Chlorhydrate verwandelt und deren alkoholische Lösung mit Platinchlorid gefällt. Die Chloroplatinate werden durch fraktionierte Krystallisation aus Wasser getrennt.

Anscheinend die gleiche Verbindung wie Dombrowski isolierten Kutscher und Lohmann zunächst aus dem Harn eines mit Fleischextrakt gefütterten Hundes, dann aus dem Harn von normalen Menschen, später Engeland<sup>1)</sup> aus dem Harn von Kaninchen nach Fütterung von salzsaurem Carnitin. Sie fanden das Goldsalz in der Mutterlauge des Goldsalzes vom Pyridinmethylchlorid, das nach dem S. 706 beschriebenen Verfahren dargestellt war. Es schied sich zunächst als Öl, dann dimorph in Blättchen und Säulen krystallisierend aus und schmolz zwischen 155—160° zu einer klaren roten Flüssigkeit. Ausbeute 0,156 g aus 10 Liter Harn.

Kutscher und Lohmann betrachteten das Goldsalz als das des Novains, das Kutscher aus dem Fleischextrakt isoliert hatte. Die Base aus dem Harn zeigte die gleichen charakteristischen Giftwirkungen wie das Novain aus Fleischextrakt (Kutscher und Lohmann<sup>2)</sup>).

Da neuerdings Kutschers Mitarbeiter Engeland die von Krimberg schon angenommene Identität des Carnitins und Novains seinerseits bewiesen hat, und dem Carnitin die Formel  $C_7H_{15}NO_3$  zukommt, so muss die Frage nach der Konstitution der Base aus dem Harn noch als unerledigt gelten. Trotz einiger Abweichungen im Verhalten liegt der Gedanke nahe, dass sie mit dem  $\gamma$ -Butyrobetain identisch ist, das Takeda<sup>2)</sup> aus dem Hundeharn nach Phosphorvergiftung isoliert hat.

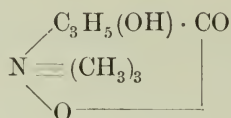
Ähnliches gilt von der als Reduktonovain bezeichneten Base von Kutscher<sup>3)</sup>, deren Goldsalz in einer Ausbeute von 2 g aus 100 Liter Frauenharn erhalten wurde. Die Base fiel zusammen mit dem Mingin (s. S. 717) als Goldsalz. Bei der Darstellung der Chloride aus dem Goldsalzgemenge blieb das Chlorhydrat der Base in der alkoholischen Lösung, wurde daraus mit alkoholischer Sublimatlösung gefällt und durch Überführung des Quecksilber-Doppelsalzes in das Chloraurat isoliert. Nach zweimaligem Umkrystallisieren aus stark salzsäurehaltigem Wasser wurde das Chloraurat rein erhalten. Es ist gegen Licht empfindlich, beginnt an der Luft schon bei 80° zu sintern und sich zu verfärben. Im Schmelzröhrchen sintert es erst bei 125°, schmilzt zwischen 155—160°, wird aber erst zwischen 175—180° ganz klar. Die

<sup>1)</sup> Kutscher und Lohmann, Zeitschr. f. physiol. Chem. 48. 1. 1906. — R. Engeland, Zeitschr. f. Unters. d. Nahrungs- u. Genussm. 16. 664. 1908.

<sup>2)</sup> Kutscher und Lohmann, Pflügers Arch. 114. 553. 1906. — R. Engeland, Berichte d. chem. Gesellsch. 42. 2457. 1909. — R. Krimberg, Zeitschr. f. physiol. Chem. 55. 466. 1908. — K. Takeda, Pflügers Arch. 133. 365. 1910.

<sup>3)</sup> Kutscher, Zeitschr. f. physiol. Chem. 51. 458. 1907.

Analyse führt, vorausgesetzt dass das Salz ganz einheitlich war, zu der Formel  $C_7H_{16}NOCl \cdot AuCl_3$ . Die Base spaltet, mit Baryt destilliert, Trimethylamin ab, wodurch ihre Zugehörigkeit zur Gruppe der Choline bzw. Betaine erwiesen ist. Wie sie sich vom Carnitin bzw. Novain ableitet, das nunmehr sowohl von Krimberg wie von Engeland als ein  $\gamma$ -Trimethyl-oxybutyrobetain



angesehen wird, ist noch unentschieden.

### Anhang.

#### Die Abspaltung von Trimethylamin aus Harn.

Dessaigues stellte bereits im Jahre 1856 fest, dass aus alkalisch gemachtem Harn Trimethylamin abdestilliert werden kann. De Filippi bestätigte die Erfahrung von Dessaigues, indem er mittels einer quantitativen Methode aus normalen Menschenurinen durch Destillation mit Kalilauge Trimethylaminmengen von etwa 2—5 cg pro Liter gewann. Er hielt das Trimethylamin für ein normales Stoffwechselprodukt, dessen Menge namentlich durch den Fleischgehalt der Nahrung vermehrt würde. Takeda aber zeigte neuerdings, dass man bei Anwendung einer dem Ammoniakbestimmungsverfahren von Krüger-Reich und Shaffer nachgebildeten Methode, die den Nachweis — wenn auch nicht die quantitative Bestimmung — von präformiertem Trimethylamin gestattet, aus frischem Menschen-, Hunde- und Pferdeharn kein Trimethylamin erhält. Wenn die Base sich aus Menschenharn gewinnen liess, so hatte der Harn schon mindestens 24 Stunden gestanden. Da aber bei der Fäulnis des Harns sich Trimethylamin bildet, wie ebenfalls Takeda nachwies, so ist bisher kein Beweis dafür erbracht, dass es im normalen Harn präformiert vorkommt. Erdmann sowohl wie Kinoshita<sup>1)</sup> konnten mit anderen Methoden im wesentlichen Takedas Resultate bestätigen.

Die Beobachtung de Filippis, dass Fleischnahrung die Menge des gewinnbaren Trimethylamins erhöht, spricht für die Auffassung von

<sup>1)</sup> Dessaigues, Liebig's Ann. d. Chem. **100**. 218. 1856 — De Filippi, Zeitschr. f. physiol. Chem. **49**. 433. 1906. — Takeda, Pflügers Arch. **129**. 82. 1909. — C. C. Erdmann, Journ. of biol. Chem. **8**. 57. 1910. — T. Kinoshita, Zentralbl. f. Physiol. **24**. 776. 1910.

Kutscher, dass die von ihm aus dem Harn isolierten Basen, die wahrscheinlich mit dem Carnitin des Fleisches in Zusammenhang stehen, die Muttersubstanzen der flüchtigen Basen sind.

Ob im normalen Harn auch noch andere Trimethylamin abspaltende Körper vorkommen, ist nicht bekannt. Liebreich<sup>1)</sup> erwähnt gelegentlich ohne nähere Angaben, in dem Urin lasse sich in sehr kleinen Mengen eine Base nachweisen, die ein dem Neurin sehr ähnliches Verhalten zeige. Bezüglich des etwaigen Vorkommens von Cholin oder Neurin im Harn bei Morbus Addisonii s. S. 739.

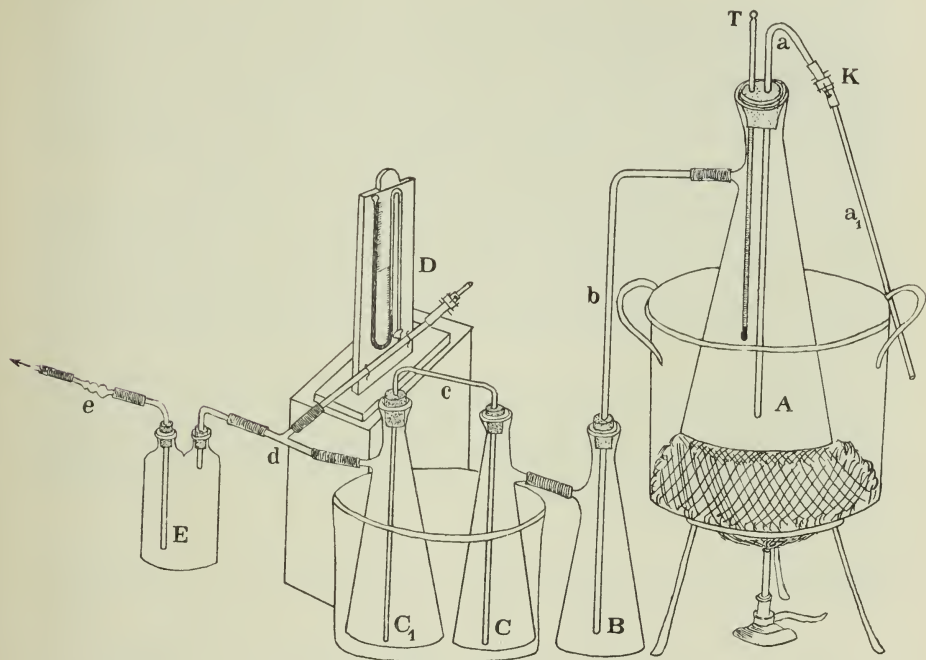


Fig. 39.

#### 1. Nachweis von Trimethylamin nach Takeda:

Da es sich um den Nachweis geringer Mengen Trimethylamin handelt, muss die für die Ammoniakbestimmung nach Krüger-Reich (s. S. 532) gebrauchte Apparatur in der Weise abgeändert werden, wie es die Abbildung zeigt.

Das Gefäß A ist das Destillationsgefäß. Es besteht aus einer dickwandigen, 3 Liter fassenden Saugflasche, die in einem mit Wasser gefüllten Emailtopf auf einem Strohkranz steht. B ist eine kleine Saugflasche; dieselbe dient als Vorlage, um bei etwaigem Übersäumen des Harns die aus A übertretende Flüssigkeit aufzunehmen. B enthält so viel verdünnte Salzsäure, dass der Boden davon bedeckt ist. C und C<sub>1</sub> sind die eigentlichen Absorptionsgefäße. Sie sind zu  $\frac{1}{6}$  mit verdünnter Salzsäure gefüllt, in die das U förmig gebogene, bis auf den Boden

<sup>1)</sup> O. Liebreich, Berichte d. chem. Gesellsch. 2. 12. 1868.

von C und C<sub>1</sub> reichende Verbindungsrohr c beiderseits eintaucht. C und C<sub>1</sub> stehen in einem mit Eiswasser gefüllten Topf. Durch ein T-Stück steht C<sub>1</sub> mit dem Manometer D, andererseits mit der Wulfschen Flasche E in Verbindung. Von E führt das Rohr e zur Wasserstrahlpumpe. Um in das Destillationsgefäß A Alkohol nachzufüllen, ist in den abschliessenden Stopfen ausser dem Thermometer T ein gebogenes Rohr a eingefügt, das durch einen Gummischlauch mit dem Glasrohr a<sub>1</sub> beweglich verbunden ist. Der Gummischlauch kann durch die Klemmschraube K geschlossen werden.

Beim Gebrauch wird A mit 1 Liter des zu untersuchenden Harns, 100 ccm Alkohol und 400 ccm Kalkmilch oder 8—10 g Magnesiumoxyd beschickt. Das Wasserbad, in dem A steht, wird auf 40° erwärmt, die Klemmschraube K geschlossen und der Druck im ganzen System mittelst der Pumpe auf 35 mm Hg gebracht. Bei Beginn der Destillation schäumt der Harn häufig stark. Um ein Übertreten des Schaumes in das Gefäß B zu verhindern, lockert man zuweilen die Klemmschraube K etwas, so dass ein wenig Luft nach A eintreten kann. Sehr bald aber siedet die Flüssigkeit in A ganz ruhig und ohne Schaumbildung. Man schliesst dann K fest und lässt die Flüssigkeit die gewünschte Zeit bei 30—40 mm Hg Druck kochen. Zum Schluss des Versuches saugt man durch a<sub>1</sub> noch 50 ccm Alkohol nach, welche den Kolbeninhalt wieder in lebhaftes Sieden bringen.

Nach Beendigung des Versuches wird das in den Vorlagen B, C und C<sub>1</sub> gesammelte Destillat sorgfältig in eine Schale gespült, darin zur Trockne verdunstet und der Rückstand mit Alkohol extrahiert. Das alkoholische Extrakt wird ebenfalls zur Trockne verdampft, wieder mit Alkohol aufgenommen. Der verbleibende Rückstand wird nochmals in Alkohol gelöst, aus der Lösung wird der Alkohol verjagt, der Rückstand in einem Tropfen verdünnter Salzsäure gelöst und mit 30 % iger wässriger Goldchloridlösung gefällt. Ein auftretender Niederschlag zeigt Trimethylamin an.

Andere flüchtige Basen, die schwer lösliche Goldsalze bilden, treten nach Takedas Erfahrungen im normalen Harn nicht auf. Bei 20 Minuten langem Destillieren wurden von Trimethylamin, das einem von der Base freien Harn zugesetzt war, ungefähr  $\frac{1}{3}$ , bei 40 Minuten langem Kochen ungefähr die Hälfte der Base als Goldsalz wiedergefunden. Die vorgenommenen Goldbestimmungen stimmten auf Trimethylaminchloraurat.

## 2. Bestimmung des mit Alkalien aus dem Harn abspaltbaren Trimethylamins nach de Filippi.

A. Prinzip. Das Gemisch der Basen, welche bei Destillation des Harns aus alkalischer Lösung übergehen, wird in Salzsäure aufgefangen, die zur Trockne gedampften Chlorhydrate durch Alkoholextraktion vom Chlorammonium getrennt und in wässriger Lösung mit Natriumhypobromitlösung zersetzt. Dabei werden die primären und sekundären Amine unter Stickstoffentwicklung zersetzt, während das Trimethylamin unzersetzt bleibt, wenn man den Überschuss von Hypobromit sofort durch Ansäuern unschädlich macht, nachdem die Stickstoffentwicklung aufgehört hat. Damit bei der Einwirkung der alkalischen Hypobromitlösung auf das salzsaure Trimethylamin nicht ein Teil der Base entweicht, muss dieser Teil der Operation in dem durch eine Salzsäurevorlage abgeschlossenen Destillationsapparate, an dem mit Rücksicht auf das freiwerdende Brom Kork und Gummistopfen vermieden sind,



ausgeführt werden. Das während der Zersetzung mit Bromlauge in die Vorlage übergegangene, in Salzsäure aufgefangene Trimethylamin wird zur Trockne verdampft, das im Destillationskolben zurückgebliebene mit Alkali destilliert, ebenfalls in Salzsäure aufgefangen, die so gewonnene Hauptmenge des Chlorhydrats mit der ersten Portion vereinigt und auf wenige ccm eingedampft. Diese Lösung des gesamten Trimethylaminsalzes wird alkalisch gemacht und destilliert. Das Destillat wird in titrierter Säure aufgefangen und durch Zurücktitrieren mit Lauge die Menge der übergegangenen Base bestimmt.

B. Ausführung: Die Tagesmenge Harn wird in einen 3 Liter-Kolben gebracht, der 10–15 g Kalilauge (10 g KOH pro Liter Harn) und einige Paraffinstückchen zum Verhindern des Schäumens enthält, und im Wasserdampfstrom destilliert. Als Vorlage dient ein mit einem Péligotschen Rohr abgeschlossener Erlenmeyerkolben mit doppelt durchbohrtem Stopfen. Durch die eine Bohrung ragt das Ende des senkrecht absteigenden Kühlers, der oben eine Sicherheitskugel wie bei der Destillation der Kjeldahlbestimmungen trägt, in den Kolbenhals, in der anderen befindet sich die Glasröhre, die zum Péligotschen Rohr führt. Dieses enthält Glasperlen, die mit verdünnter Salzsäure eben bedeckt sind. Im Sammelkolben befinden sich 100 bis 150 ccm auf  $\frac{1}{3}$  verdünnter Salzsäure von 1,19 D. Man erwärmt zunächst langsam; nach Beginn der Destillation lässt man kräftig sieden und reguliert den Dampfstrom so, dass das Flüssigkeitsvolum im Destillationskolben annähernd konstant bleibt. In  $1\frac{1}{2}$  Stunden soll man etwa 1 Liter Destillat erhalten. Bei dieser Geschwindigkeit der Destillation ist alles Trimethylamin aus normalem Harn übergegangen, wenn das Volum des Destillats  $\frac{2}{3}$  des angewandten Harnvolums ausmacht.

Nachdem man sich vergewissert hat, dass der Inhalt des Sammelkolbens sauer reagiert, führt man das Destillat und die durch Auswaschen der Glasperlen erhaltene Flüssigkeit quantitativ in eine grosse Schale über, dampft über freier Flamme, ohne zum Sieden kommen zu lassen, auf 200–300 ccm, dann auf dem Wasserbade zur Trockne ein, zum Schluss unter Zusatz von etwas Alkohol.

Der Rückstand in der Schale wird mit einem Stössel pulverisiert und wiederholt mit kleinen Mengen absoluten Alkohols extrahiert. Die alkoholische Lösung wird in einer Porzellanschale, die gross genug ist, dass die Flüssigkeit nicht über den Rand steigt, auf dem Wasserbad verdunstet, ohne dass der Alkohol ins Sieden kommt. Die Extraktion mit absolutem Alkohol wird noch zweimal mit kleineren Mengen wiederholt.

Der Rückstand der alkoholischen Lösung wird in wenigen ccm Wasser aufgenommen und die gelbliche Lösung in einen Jenenser Kolben von 300 ccm Inhalt gebracht, der mit dem oben beschriebenen Kühler durch einen eingeschlifften Glasstöpsel verbunden ist. Im Glasstöpsel ist ausser der Verbindung mit dem Kühler noch der Stiel eines Hahntrichters von 50–60 ccm Inhalt eingeschmolzen. Auch die Verbindung des Kühlers mit dem 500–600 ccm fassenden Sammelkolben (Erlenmeyer), der wiederum durch ein Péligotsches Rohr abgeschlossen ist, und die des Destillationsaufsatzes mit dem Kühler sind durch eingeschlifene Glasstopfen hergestellt. Das Péligotsche Rohr und der Sammelkolben enthalten 15–20 ccm verdünnte Salzsäure. Aus dem Hahntrichter lässt man 25 ccm Hypobromitlösung (25 ccm Brom in 500 ccm einer 20 %igen Kalilauge) in den Destillationskolben tropfen und schüttelt vorsichtig das Gemisch von Hypobromit und Chloriden; falls nach dem schwachen Aufschäumen die Flüssigkeit nicht ausgesprochen zitronengelbe Farbe annimmt, ist noch neue Hypobromitlösung zuzufügen.

Um den Überschuss von Hypobromit zu beseitigen, giesst man durch den Trichter in den Kolben ebenso viele ccm auf  $\frac{1}{3}$  verdünnte Salzsäure (D = 1,19), als Hypobromitlösung verwendet wurde. Wegen der kleinen Mengen Trimethyl-



amin, die aus dem Urin zu erhalten sind, bildet sich nicht der orangerote Niederschlag, den grössere Mengen geben; doch zeigt sich zuweilen eine leichte, vorübergehende Trübung. Durch das freigewordene Brom nimmt die Flüssigkeit eine kirschrote Färbung an.

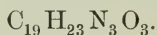
Das Brom wird abdestilliert und geht schnell mit dem Wasserdampf in den Sammelkolben über. Man unterbricht die Destillation, wenn der Inhalt des Destillationskolbens seine ursprüngliche gelbliche Färbung wieder angenommen und das Volum sich etwa auf die Hälfte oder weniger reduziert hat. Man ersetzt den Sammelkolben durch einen anderen ebenfalls 10–15 cm verdünnte Salzsäure enthaltenden; die im Kühlerrohr noch vorhandenen Bromdämpfe werden ausseracht gelassen. Der Inhalt des ersten Sammelkolbens, der das Brom enthält, wird sofort zum Eindampfen auf das Wasserbad gebracht.

Um die Hauptmenge des Trimethylamins abzudestillieren, macht man den Inhalt des Destillationskolbens alkalisch, mit einem Volum einer 30 %igen Kalilauge, das dem Volum der vorher verwandten Salzsäure entspricht; hierbei entfärbt sich die bis jetzt gelbliche Flüssigkeit. Die Destillation geht ruhig vor sich, wenn man in den Kolben einige am einen Ende geschlossene Kapillaren gebracht hat. Durch Zutropfenlassen von Wasser aus dem Hahntrichter hält man das Flüssigkeitsniveau im Kolben während der Destillation annähernd konstant. Wenn kein alkalisch reagierendes Destillat mehr übergeht (Prüfung mit Lakmuspapier), unterbricht man die Destillation, führt das Destillat und den Inhalt des Péligotschen Rohres quantitativ in die Schale über, die das erste Destillat enthielt, aus dem inzwischen das Brom vertrieben wurde, und dampft den Schaleninhalt auf wenige ccm ein.

Während des Eindampfens füllt man in das Péligotsche Rohr und den Sammelkolben zusammen 25 ccm  $n_{10}$  Salzsäure und schliesst beide wieder an den Apparat an. Der Rückstand des eingedampften Destillats wird wieder in den Destillationskolben gebracht, durch 50 ccm 10 %ige Kalilauge, die durch den Trichter eingeführt werden, alkalisch gemacht und das Trimethylamin in die titrierte Salzsäure überdestilliert. Zum Schluss wird der Inhalt des Sammelkolbens und des Péligotschen Rohres durch  $n_{10}$ -Kalilauge titriert.

Der ganze Prozess nimmt  $2\frac{1}{2}$  Tage in Anspruch. Der Verlust an zugesetztem Trimethylamin in Kontrollversuchen betrug 1,3 %.

## V. Gynesin.



Kutscher und Lohmann<sup>1)</sup> erhielten aus der Mutterlauge des Goldsalzes vom Pyridinmethylchlorid (s. S. 705) beim langsamen Eindunsten ein in kräftigen, vierseitigen, rotgelben Säulen krystallisierendes Goldsalz, das dreimal aus heissem Wasser umkrystallisiert wurde. Bei schnellem Abkühlen fiel es sofort in dünnen, hellgelben Nadelchen aus, die bei 180° zu einer trüben Masse, zwischen 205–210° zu einer klaren, dunkelroten Flüssigkeit zusammenschmolzen. Die Ausbeute an Goldsalz betrug 1,5 g aus 100 Liter Harn. Aus der Analyse wurde die Formel  $\text{C}_{19}\text{H}_{23}\text{N}_3\text{O}_3 \cdot 2\text{HCl} \cdot 2\text{AuCl}_3$  berechnet. Die zweisäurige, aus Frauenharn erhaltene Base wurde Gynesin genannt.

<sup>1)</sup> Kutscher und Lohmann, Zeitschr. f. physiol. Chem. 49. 85. 1906.

## VI. Mingin.



Das Goldsalz des zweisäurigen Mingins wurde von Kutscher<sup>1)</sup> bei der Verarbeitung der 100 Liter Frauenharn wie folgt erhalten.

Das Filtrat der zweiten Platinfällung (s. Darstellung des Pyridinmethylchlorids) wurde eingengt, wobei sich noch ein kleiner Anteil Platinsalz krystallinisch abschied; die Mutterlauge dieser Krystalle wurde zur Trockne verdampft, in Wasser aufgenommen und in der mehrfach beschriebenen Weise in die Chlorhydrate verwandelt, diese mit absolutem Alkohol aufgenommen und wieder mit 20 %iger Platinchloridlösung gefällt. Der Niederschlag wurde abgesaugt, mit den vorher ausgeschiedenen Platinsalzen vereinigt, und diese vereinigten Platinate in der beschriebenen Weise erst in die Chlorhydrate, dann in die Goldsalze übergeführt. Die ölig abgeschiedenen Goldsalze wurden mit den ebenfalls öligen Goldsalzen, die sich aus den Mutterlaugen des Methylpyridinium- und des Gynesis-Chloraurats abgeschieden hatten, vereinigt, in heissem Wasser unter Zusatz einiger Tropfen starker Salzsäure gelöst, in die Chlorhydrate übergeführt und zum dünnen Sirup eingengt. Nach mehrtägigem Stehen im Exsiccator erstarrten sie zu einem Krystallbrei, der mit kaltem absoluten Alkohol verrieben wurde. Dabei blieb der kleinere Teil ungelöst als lange, weisse Nadeln zurück. Diese wurden abgesaugt, mit Alkohol gewaschen, in wenig Wasser gelöst und mit 30 %iger Goldchloridlösung gefällt. Das Goldsalz, aus wenig heissem, salzsäurehaltigem Wasser umkrystallisiert, schied sich beim Erkalten sofort in kleinen, durchsichtigen, gelbroten, vierseitigen Säulen ab, die bei 194° scharf schmolzen. Ausbeute: 0,45 g. Aus der Analyse wurde die Formel  $\text{C}_{13}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_2 \cdot 2\text{HCl} \cdot 2\text{AuCl}_3$  berechnet.

## VII. Kynosin.



Aus 17 Liter normalem Hundeharn gewannen Kutscher und Lohmann<sup>2)</sup> das Goldsalz einer giftigen Base, für das sie unter der Annahme, dass es eine einheitliche Verbindung sei, die Formel  $\text{C}_{13}\text{H}_{26}\text{N}_4\text{O}_4 \cdot 2\text{HCl} \cdot 2\text{AuCl}_3$  berechneten.

Die Isolierungsmethode war folgende:

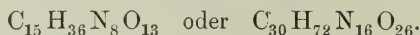
Der mit Salzsäure angesäuerte Harn wurde nach Entfernung der auskrystallisierten Kynurensäure mit Phosphorwolframsäure gefällt. Die aus der Fällung gewonnenen Basen wurden in die Chlorhydrate übergeführt, diese mit Alkohol aufgenommen und mit 20 %iger alkoholischer Platinchloridlösung gefällt. Die Platinsalze wurden zersetzt und in die Goldsalze übergeführt. Das erhaltene Öl wurde wieder mit Schwefelwasserstoff zersetzt und die Überführung in die Platin- und dann in die Goldsalze nochmals wiederholt. Die beim zweiten Male erhaltene Goldfällung krystallisierte bald. Die Krystalle veränderten beim Umkrystallisieren ihren (nicht angegebenen) Schmelzpunkt nicht. Ausbeute: 0,65 g Goldsalz. Aus der Analyse berechnet Kutscher die Formel:  $\text{C}_{13}\text{H}_{26}\text{N}_4\text{O}_4 \cdot 2\text{HCl} \cdot 2\text{AuCl}_3$ .

Das aus 95 mg der Goldverbindung dargestellte, in feinen Nadeln krystallisierende Chlorhydrat tötete eine Maus in einer Stunde.

<sup>1)</sup> Kutscher, Zeitschr. f. physiol. Chem. 51. 458. 1907.

<sup>2)</sup> Kutscher und Lohmann, Zeitschr. f. physiol. Chem. 48. 3 und 49. 88. 1906.

## VIII. Protaminähnliche Verbindung von Engeland.



Engeland<sup>1)</sup> stellte aus normalem Menschenharn das Goldsalz einer protaminähnlichen, aber wesentlich sauerstoffreicheren Verbindung (für Scombrin ist die Formel  $\text{C}_{30}\text{H}_{70}\text{N}_{16}\text{O}_6$  berechnet) auf folgendem Wege dar:

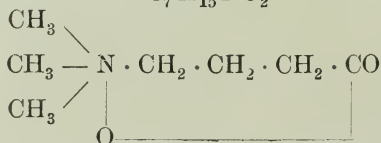
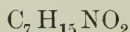
Der Harn (40 Liter) wurde vorbehandelt, wie es auf S. 632, Absatz 1 bei der Isolierung des Histidins beschrieben ist. Die schmierig sich abscheidende Platinfällung wurde mit absolutem Alkohol gewaschen und in heissem Wasser gelöst, vom schwer löslichen Platinsalmiak wurde abfiltriert und das die löslichen Platinsalze enthaltende Filtrat in der üblichen Weise in die Chlorhydrate, dann in die Goldsalze übergeführt. Nach mehrtägigem Stehen unter dem Exsiccator krystallisierte ein Goldsalz aus, das abgesaugt und aus heisser verdünnter Salzsäure umkrystallisiert wurde. Beim Umkrystallisieren trat jedesmal starke Reduktion auf. Deshalb wurde das Goldsalz in wenig konzentrierter, heisser Salzsäure gelöst und in eine mit Eis gekühlte Saugflasche filtriert, aus der es ohne Reduktion auskrystallisierte. Engeland spricht es als Goldsalz des Vitiatins (s. o. S. 702) an.

Aus der Mutterlauge dieses Goldsalzes krystallisierte nach wochenlangem Stehen unter dem Exsiccator eine Goldverbindung in rotgelben Oktaedern aus, die aus verdünnter Salzsäure, worin sie ebenso wie in Wasser sehr leicht löslich ist, umkrystallisiert wurde. Bei langsamer Ausscheidung aus heisser konzentrierter Salzsäure bildet sie Krystallwarzen, die sehr hygroskopisch sind, sich bei 100° schwärzen und sich bei stärkerem Erhitzen langsam unter starkem Aufblähen zersetzen. Die Ausbeute betrug 0,5 g Goldsalz, doch blieb viel zurück.

Die Analyse führte zu der Formel  $\text{C}_{15}\text{H}_{36}\text{N}_8\text{O}_{13} \cdot \text{HCl} \cdot \text{AuCl}_3$  bezw. einem Multipolum derselben.

Das (nicht analysierte) Platinsalz ist leicht löslich, schwer nur in absolutem Alkohol. Das aus dem Goldsalz regenerierte Chlorhydrat gibt Biuretreaktion und die Farbenreaktionen des Histidins mit Diazobenzolsulfosäure und mit Bromwasser (s. S. 633, Nr. 11, 12), während die Millonsche Probe negativ ausfällt.

## Basen aus dem Harn mit Phosphor vergifteter Hunde.

I.  $\gamma$ -n-Butyrobetain.

Syn.  $\gamma$ -Trimethyl-n-butyrobetain.

Die Verbindung wurde synthetisch von Willstätter<sup>2)</sup> durch erschöpfende Methylierung der  $\gamma$ -Aminobuttersäure, die durch Verseifung von Pyrrolidon gewonnen war, mit Jodmethyl in alkalisch-methylalkoholischer Flüssigkeit erhalten. Durch

<sup>1)</sup> R. Engeland, Zeitschr. f. physiol. Chem. 57. 57. 1908.

<sup>2)</sup> R. Willstätter, Berichte d. chem. Gesellsch. 35. 617. 1902.

Neutralisieren mit Jodwasserstoffsäure und Zufügen der erforderlichen Menge Jod, in Jodwasserstoffsäure gelöst, wird das Produkt in Form eines dunkelbraunen krystallinischen Perjodids gefällt. Das abgesaugte, gewaschene Perjodid verliert bei der Destillation mit Wasserdampf das addierte Jod quantitativ und liefert eine fast farblose Lösung des Jodhydrats; die mit Silberoxyd in das Betain übergeführt wird. Von etwas beigemengtem Kaliumcarbonat kann es durch Behandlung mit absolutem Alkohol leicht gereinigt werden.

A. Vorkommen. Takeda<sup>1)</sup> isolierte die Base aus dem Harn mit Phosphor vergifteter Hunde als Goldsalz und identifizierte das Platinsalz durch Vergleich mit dem von Willstätter gewonnenen Salz des synthetischen Betains, nachdem er die Betainnatur der analysierten Verbindung durch Veresterung und Abspaltung von Trimethylamin festgestellt hatte.

Die Substanz steht als Reduktionsprodukt des Carnitins (Krimberg, Engeland) sicher in naher Beziehung mit den von Kutscher und Lohmann gefundenen und als Novain bezw. Reduktonovain bezeichneten Basen (s. S. 711), doch lassen die bisherigen Angaben über diese an der Identität zweifeln. Dagegen scheint nach Takedas Feststellungen die Base identisch zu sein mit der von Brieger<sup>2)</sup> aus faulem Fleisch isolierten.

B. Eigenschaften. 1. Das  $\gamma$ -n-Butyrobetain ist in absolutem Alkohol sehr leicht löslich; auf Zusatz von Äther zur Lösung in wasserhaltigem Alkohol krystallisiert es in der Kälte in schneeweissen Krystallblättchen aus, wenn man eine zu rasche Ausfällung vermeidet. Dieselben verwittern an der Luft und ziehen wieder Feuchtigkeit an, sie enthalten wahrscheinlich 3 Mol. Krystallwasser. Die wasserfreie Substanz erweicht im Kapillarrohr bei  $130^{\circ}$ , schrumpft dann allmählich zusammen und schäumt bei ca.  $222^{\circ}$  auf, ohne zu schmelzen (Willstätter).

2. Das Chlorhydrat  $C_7H_{15}NO_2 \cdot HCl$  krystallisiert in Nadeln, die in absolutem Alkohol schwer löslich sind, und schmilzt bei  $200^{\circ}$ , bei  $195^{\circ}$  fängt es an zu sintern, es schmeckt süßsauer (Takeda). Mit Kaliumquecksilberjodid entsteht eine ölige Fällung, die im Überschuss des Reagens löslich ist; sie wird nach einiger Zeit krystallinisch. Ebenso verhält es sich gegen Kaliumcadmiumjodid und Jodjodkalium. Dragendorffs Reagens (Jodwismut-Jodkalium) gibt rotbraune, amorphe Fällung, die sich nach einiger Zeit in vierseitige, rhombische Plättchen umwandelt; sie ähneln den Krystallen des salpetersauren Harnstoffs (Takeda). Mit Phosphormolybdänsäure entsteht eine gelbe, mit Phosphorwolframsäure eine weisse Fällung, mit alkoholischer Sublimatlösung ein in Wasser leicht lösliches Quecksilber-Doppelsalz (Brieger).

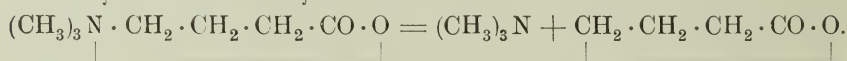
<sup>1)</sup> K. Takeda, Pflügers Arch. 133. 365. 1910.

<sup>2)</sup> L. Brieger, Über Ptomaine III. 27. Berlin 1886.



— Das Chloraurat  $C_7H_{16}NO_2 \cdot Cl \cdot AuCl_3$  krystallisiert dimorph in hellgelben Nadeln und Plättchen vom Schmelzpunkt  $176^\circ$  (Brieger, Takeda). — Das Chloroplatinat  $C_{14}H_{32}N_2O_4Cl_6Pt$  ist in kaltem Wasser ziemlich leicht, in warmem sehr leicht, in Alkohol auch in der Hitze fast gar nicht löslich. Aus konzentrierter Lösung krystallisiert es wasserfrei in hellroten, vier- und sechseckig begrenzten, länglichen Täfelchen und in flächenreichen Prismen, die bei  $224\text{--}225^\circ$  (Willstätter) bezw.  $225\text{--}228^\circ$  (Takeda) unter Zersetzung schmelzen.

3. Mit Baryt erhitzt spaltet das Chlorhydrat Trimethylamin ab (Takeda). Das trockne Betain zersetzt sich beim Destillieren in Trimethylamin und Butyrolacton.



4. Physiologische Wirkung. Das Chlorhydrat bewirkt, subkutan injiziert, schon in Dosen von 5 mg bei Mäusen Diarrhöe, Dyspnoe und reichliche Salivation. 15 mg töten eine Maus in 5 Minuten. Bei Fröschen tritt eine curareartige Wirkung und Herzstillstand in Diastole ein (Takeda, Brieger). Genauere Beschreibung des Vergiftungsbildes namentlich von Meerschweinchen siehe bei Brieger.

C. Darstellung. 65 Liter Harn von Hunden, die mit Phosphor vergiftet waren, wurden bis zur zweiten Silberfällung so behandelt, wie zur Isolierung des Methylguanidins nach Achelis (s. S. 698). Das Filtrat vom Silberniederschlag II wurde durch Salzsäure vom Silber, durch Schwefelsäure vom Baryt befreit, und nach dem Ansäuern mit Schwefelsäure mit Phosphorwolframsäure aufs neue gefällt.

Aus dieser zweiten Phosphorwolframsäure-Fällung wurde wie üblich die Lösung der kohlen sauren Basen gewonnen und diese zum Sirup eingeengt. Der Sirup wurde mit Salzsäure angesäuert und bis zur beginnenden Krystallisation eingedampft. Der Schaleninhalt wurde mit Methylalkohol aufgenommen, von anorganischen Salzen wurde abfiltriert, das methylalkoholische Filtrat eingedampft und mit Äthylalkohol aufgenommen. Die Extraktion mit Äthylalkohol wurde dreimal wiederholt, wobei jedesmal vom unlöslichen Rückstand abfiltriert wurde, schliesslich wurde die alkoholische Lösung mit Quecksilberchlorid in der Hitze gesättigt. Der Niederschlag der schwerlöslichen Quecksilberverbindungen wurde nach 24 stündigem Stehen abgesaugt und mit gesättigter alkoholischer Sublimatlösung gewaschen.

Die Sublimatfällung wurde in der üblichen Weise in die Chlorhydrate übergeführt, diese mit Alkohol aufgenommen, wobei ein krystallinisches Chlorhydrat zurückblieb, das in Wasser gelöst und als Goldsalz gefällt wurde (Verbindung  $C_{13}H_{26}N_2O_3$  siehe folgender Abschnitt).



Das alkoholische Filtrat von dem krystallinischen Chlorhydrat  $C_{13}H_{26}N_2O_3 \cdot 2HCl$  wurde zum dünnen Sirup eingedampft und mit alkoholischem 20 % igem Platinchlorid gefällt. Die Platinfällung wurde in heissem Wasser gelöst, von etwas Platinsalmiak abfiltriert, das Filtrat in die Goldsalze übergeführt. Diese scheiden sich zunächst teils ölig, teils krystallinisch ab. Der in Wasser schwerer lösliche Teil bestand aus dem Chloraurat des Butyrobetains, das nach dreimaligem Umkrystallisieren rein war.

## II. Die Base $C_{13}H_{26}N_2O_3$ . (Takeda)

Die Gewinnung der Base als Goldsalz wurde im vorigen Abschnitt. beschrieben. Ihr Chlorhydrat ist wenig hygroskopisch, in Wasser leicht, in Alkohol schwer löslich und schmilzt bei  $214-216^\circ$ . Bei trockner Destillation treten nach Trimethylamin riechende Dämpfe auf. Es schmeckt süßsauer. Jodjodkalium und Kaliumcadmiumjodid liefern keine, Kaliumquecksilberjodid eine ölige Fällung, die sich im Überschuss des Fällungsmittels löst, Dragendorffs Reagens einen starken Niederschlag von roten Nadeln.

Das Goldsalz  $C_{13}H_{26}N_2O_3 \cdot 2AuCl_4$  bildet derbe, hellgelbe Nadeln und schmilzt bei  $165^\circ$ , es ist in Wasser ziemlich schwer löslich.

Das Chlorhydrat liefert, mit salzsäurehaltigem, absolutem Alkohol auf dem Wasserbad erwärmt, einen Ester, der mit alkoholischer Platinchloridlösung sich als in Wasser schwer lösliches Platinsalz abscheidet:  $C_{12}H_{27}N_2O \cdot CO_2 \cdot C_2H_5 \cdot PtCl_6$ . Es schmilzt bei  $156-157^\circ$ , zersetzt sich bei  $165-170^\circ$ .

Die Substanz enthält also eine Carboxylgruppe. Sie ist isomer mit dem von Ackermann und Kutscher<sup>1)</sup> aus Krabbenextrakt gewonnenen „Crangonin“, unterscheidet sich aber von diesem durch die Schwerlöslichkeit des Chlorhydrats in Alkohol und den Schmelzpunkt des Goldsalzes.

## III. Die Base $C_{13}H_{26}N_2O_5$ . (Takeda)

In der Mutterlauge des Chloraurates vom Butyrobetain fand Takeda die leichter lösliche Goldverbindung einer zweisäurigen Base  $C_{13}H_{26}N_2O_5$ . Das Goldsalz scheidet sich immer erst als Öl aus, krystallisiert nach einiger Zeit und schmilzt bei  $110^\circ$ . — Das Chlorhydrat bildet einen hygroskopischen Sirup, der über Schwefelsäure allmählich in Nadeln krystallisiert und süßsauer schmeckt. Die Lösung dreht den polarisierten Lichtstrahl nach links. Mit Kaliumwismutjodid

<sup>1)</sup> D. Ackermann und F. Kutscher, Zeitschr. f. Unters. d. Nahrungs- u. Genussm. 14. 687. 1906.

entsteht körnige, rotbraune Fällung, mit Kaliumquecksilberjodid weisser, im Überschuss des Fällungsmittels löslicher Niederschlag, mit Pikrinsäure und mit Pikrolonsäure keine Fällung.

Die Verbindung lässt sich wie die vorige verestern, wobei zwei Carboxylgruppen Äthyl aufnehmen. Das Platinsalz des Esters  $C_{11}H_{26}N_2O(CO_2 \cdot C_2H_5)_2PtCl_6$  krystallisiert in Blättchen, die bei  $220^\circ$  schmelzen; in Wasser ist es nicht sehr schwer löslich.

Bei der Destillation mit Baryt liefert die Base so viel Trimethylamin, dass beide Stickstoffatome als Trimethylaminkerne darin enthalten sein müssen.

Das Chlorhydrat bewirkt in einer Dosis von 0,04 g bei intravenöser Injektion an Kaninchen eine geringe Blutdrucksenkung.

Weiterhin isolierte Takeda aus dem Harn der mit Phosphor vergifteten Hunde noch Methylguanidin, und aus der Silberfällung I (Histidinfraktion) in geringen Mengen das Chlorhydrat einer Base, die Ähnlichkeit mit den Pyrimidinbasen zeigt, aber mit keiner bekannten Pyrimidinbase identisch ist. Sie gibt die Paulysche Histidinreaktion: Rotfärbung mit Diazobenzolsulfosäure in sodaalkalischer Lösung, aber sonst keine Reaktion des Histidins.

In dem Silberniederschlag II, der das Methylguanidin enthielt, wurde vergeblich auf Arginin gefahndet. Takeda vermutet deshalb, dass das Pikrolonat, das Wohlgemuth aus dem Menschenharn nach Phosphorvergiftung erhalten und als Argininsalz angesprochen hat, das sich aber vom sonst beschriebenen Arginin-Pikrolonat unterscheidet (siehe S. 636), vielleicht das Pikrolonat einer Harnbase gewesen sei.

Über die physiologische Wirkung der einzelnen Harnfraktionen, die chemisch nicht identifiziert wurden, hat Takeda Untersuchungen an Kaninchen angestellt, die im Original einzusehen sind.

## Sonstige Versuche zum Nachweis und zur Isolierung giftiger Bestandteile aus normalen und pathologischen Harnen (Ptomaine).

Ptomaine (πτῶμα, Leichnam) nannte Selmi die bei der Fäulnis tierischer Substanz entstehenden alkaloidartigen Verbindungen (Leichenalkaloide); die giftigen derselben bezeichnet Brieger als Toxine. Für die im pathologischen Harn auftretenden Ptomaine schlug Selmi den Namen Pathoamine vor, andere brauchen dafür den Ausdruck Urotoxine. Unter Leukomainen (λευκώμα, Eiereiweiss) versteht A. Gautier die im gesunden Organismus vorkommenden Basen (Kreatinin, Xanthin etc.).

A. Vorkommen<sup>1)</sup>. Ältere und neuere physiologische Versuche haben ergeben, dass der Harn von der Blutbahn aus giftig wirkt.

<sup>1)</sup> Zusammenstellung der Literatur bis 1901 s. bei H. Singer, Arch. internat. d. pharmacodyn. S. 207. 1901.

Das charakteristische Symptomenbild bei der intravenösen Injektion des unveränderten (nur mit Natriumbicarbonat neutralisierten) Harns besteht in starker Myosis, Verlangsamung der Respiration nach vorhergegangener Beschleunigung, Polyurie, oft zugleich Diarrhöe, zunehmender Lähmung des motorischen Gebiets, Herabsetzung der Körpertemperatur, Somnolenz, Erlöschen der Reflexerregbarkeit, Atemstillstand, schliesslich Herzstillstand ohne Konvulsionen.

Der alkohollösliche Teil des Urins veranlasst besonders Narkose, Koma, Diurese, Blutdrucksteigerung und oft eine erhebliche Salivation, nicht aber Myosis und Temperaturerniedrigung. Der alkoholunlösliche Teil bewirkt Myosis, Konvulsionen und Temperaturabnahme, sowie Blutdrucksenkung.

Bei subkutaner Injektion an Mäuse verursacht das alkoholische Extrakt des im Vacuum bei 40° eingedampften Urins normaler Kaninchen und Pferde nach H. Pfeiffer<sup>1)</sup> folgende Symptome: Zunächst Depression, Mattigkeit, Polyurie, dann Unruhe, tonisch-klonische Krämpfe, die mit tonischer Starre abwechseln, später einen rauschartigen Zustand, schliesslich nach lange hingezogener Agone Tod durch Respirationsstillstand. Bei Meerschweinchen wirken die Extrakte auch nekrotisierend an der Injektionsstelle. Ferner enthalten sie eine Blutkörperchen agglutinierende Substanz.

Die Giftigkeit des menschlichen Harns ist sehr verschieden, und verschiedene Tierarten setzen der Giftwirkung des Harns einen ungleich grossen Widerstand entgegen. Nach Bouchard kann man ein Kaninchen töten, wenn man ihm pro Kilo Körpergewicht im Mittel 45 ccm normalen menschlichen Harn auf einmal mit einer Geschwindigkeit von 15—20 ccm\* pro Minute injiziert; für Hunde sind dazu nach Lépine und Aubert 60 ccm Harn auf das Kilo Körpergewicht, nach Feltz und Ritter ungefähr  $\frac{1}{15}$  vom Gewicht des Hundes erforderlich, mit wesentlichen, von der Race abhängigen Schwankungen. Den Grad der Giftigkeit des menschlichen Harns bestimmt Bouchard nach dem Gewicht Kaninchen in Kilo, welche durch die vom Kilo Körpergewicht des Versuchsindividuums in 24 Stunden entleerte Harnmenge getötet wird; diese Grösse nennt er den toxischen Coefficienten des Harns (urotox. Coeff.). Beim gesunden Erwachsenen beträgt er 0,465, in Krankheiten schwankt er zwischen 2 und 0,1. Stefani<sup>2)</sup> findet bei langsamerer Injektion Werte zwischen 0,162 und 0,069 bei Gesunden.

Ein gesunder Erwachsener scheidet also — bei Zugrundelegung des Coefficienten 0,465 — auf das Kilo seines Gewichts in 24 Stunden so viel Gift aus, dass 465 g Kaninchen getötet werden; oder, um ein Kaninchen von 1,860 kg zu

<sup>1)</sup> H. Pfeiffer, Ztschr. f. Hygiene u. Infektionskr. 54. 482. 1908.

<sup>2)</sup> Ch. Bouchard, Comptes rendus 102. 669. 1886. — R. Lépine und P. Aubert, Comptes rendus 101. 90. 1885. — Feltz und Ritter, Comptes rendus 102. 880. — N. Stefani, Arch. ital. d. biolog. 35. 289. 1900.



töten, ist die vierfache Menge Gift nötig, welche ein Erwachsener in 24 Stunden pro Kilo seines Gewichts ausscheidet.

Als Urotoxie bezeichnet Bouchard die Menge Urin, die bei intravenöser Injektion 1 kg Kaninchen tötet. Im Mittel ist, wie angeführt, 1 Urotoxie = 45 ccm Menschenurin. Die Tagesmenge Menschenharn würde also, zu 1500 ccm angenommen, ca. 33 Urotoxien enthalten.

Nach Bouchard ist die Giftigkeit des normalen Harns unabhängig von seiner Konzentration. Trotz seiner grösseren Dichte ist der Nachtharn nicht so giftig als der Tagharn. Das gleiche gilt auch von dem während des Winterschlafs entleerten Harn (Noé) der Igel. Teilt man den Tag in drei achtstündige Perioden, so verhält sich die Giftigkeit des in der Nacht sezernierten zum Vormittag- und Nachmittagharn wie 3 : 7 : 5. Dieses Verhältnis bleibt auch bestehen, wenn zum Beginn jeder Periode dieselbe Nahrung in gleicher Menge genommen wird (3 : 7,5 : 4,5). In beiden Fällen ist der Harn zu Beginn des Schlafes am wenigsten giftig, von da an nimmt seine Giftigkeit zu bis zu Ende der zweiten Periode. Lebhaftes Muskel-tätigkeit in freier Luft, sowie das Atmen von komprimierter Luft setzt die Giftigkeit des Harns herab. Den Harn körperlich ermüdeter Menschen fanden Astolfoni und Soprana giftiger als den normalen. Die Harnen der verschiedenen Tageszeiten unterscheiden sich auch in der Art der Giftwirkung; der Nachtharn verursacht Konvulsionen, der Tagharn wirkt narkotisch. Beide Gifte sind Antagonisten; ein Gemisch von Tag- und Nachtharn kann (um  $\frac{1}{3}$ ) weniger giftig sein, als sich nach der Wirkung eines jeden berechnet. Beck<sup>1)</sup> konnte das verschiedene Verhalten von Tag- und Nachtharn nicht bestätigen.

Über den Einfluss der Art der Nahrung auf die Giftigkeit des Harns haben Charrin und Roger ermittelt, dass Milchdiät und Hunger die Giftigkeit des Harns herabsetzen. Cassata<sup>2)</sup> fand nach Fleischnahrung den Harn am giftigsten.

Der Harn Neugeborener soll nach Hein giftiger, der von Kindern von 1—15 Jahren nach Lannelongue und Gaillard und nach Charrin<sup>3)</sup> weniger giftig als der Erwachsener sein.

Der Harn verschiedener Tiere besitzt einen sehr verschiedenen Grad der Giftigkeit. Nach Guinard wird bei intravenöser Injektion 1 kg Kaninchen getötet durch 193 ccm Harn vom Hunde, 132,7 ccm vom Menschen, 53 vom Schwein, 38,5 vom Rind, 35 vom Meerschweinchen, 33,8 vom Hammel, 32 von der Ziege, 29,4 vom Esel, 29,2 vom Pferd, 15 vom Kaninchen, 13 von der Katze. Die Giftigkeit des Igelharns ist etwa so gross wie die des Harns vom Meerschweinchen (Noé<sup>4)</sup>).

Wie bereits bemerkt, ist im allgemeinen der Harn von Kranken giftiger als der von Gesunden. Nach Feltz und Ehrmann ist der Harn Fieberkranker (Typhus, Scharlach, akute Tuberkulose, Pneumonie, akuter Gelenkrheumatismus)  $1\frac{1}{2}$ —2 mal so giftig wie der Gesunder. Die Giftigkeit ist auch hier nicht proportional der Dichte; Harn von 1,007 Dichte kann ebenso giftig sein wie solcher von 1,024. Gesteigerte Giftigkeit wurde auch bei Aktinomykose (Meis und Parascandolo), bei Pellagrakranken, falls sie Maiskost zu sich nahmen (Brugnola),

<sup>1)</sup> Bouchard, a. a. O. S. 727 u. 1127. — G. Astolfoni und F. Soprana, Arch. ital. d. biol. 41. 46. 1904. — A. Beck, Pflügers Arch. 71. 560. 1898.

<sup>2)</sup> Charrin und Roger, Comptes rendus de la Soc. de Biol. 1887. S. 145; Jahresber. f. Tierchem. 1887. S. 430. — Cassata, Zentralbl. f. inn. Med. 20. 1187. 1899.

<sup>3)</sup> K. Hein, Diss. St. Petersburg 1904, zit. nach Jahresb. f. Tierch. 34. 381. — Lannelongue und Gaillard, Compt. rend. Acad. d. Scienc. 128. 1493. 1899. — A. Charrin, Compt. rend. Soc. Biol. 52. 587. 1900.

<sup>4)</sup> L. Guinard, Comptes rendus de la Soc. de Biol. (9) 5. 493. 1893; Zentralbl. f. Physiol. 7. 727. — J. Noé, Compt. rend. Soc. Biol. 54. 95. 1902.

bei Appendicitis und namentlich bei diffuser Peritonitis (Lannelongue und Gaillard) gefunden. Bei Diphtherie soll nach Mariotti-Bianchi, bei Appendicitis nach Lannelongue die Giftigkeit mit der Schwere des Falles zunehmen. Ebenso ist ikterischer Harn (bei Leberaffektionen), Eiweissarn in Begleitung schwerer Nierenerkrankung, Harn bei Krebskachexie und schwerer Anämie, unabhängig von der Dichte, viel giftiger als der Gesunder. Diabetischer Harn ist, wenn der Kranke nicht kachektisch ist, trotz seiner grossen Dichte nicht giftiger als normaler. Den Harn von Epileptikern fand Lukin<sup>1)</sup> während und bald nach dem Anfall besonders giftig.

Die Symptome, welche der Harn von Kranken bewirkt, sind nach Feltz jedoch keine anderen, als die von normalem Harn hervorgerufenen; der Harn Kranker ist nur darum giftiger, weil er reicher an dem Gift des normalen Harns ist. Lépine und Aubert<sup>2)</sup> dagegen finden, dass der Fieberharn andere Erscheinungen bewirkt, als der normale, namentlich klonische Krämpfe.

Beachtenswert ist in dieser Hinsicht auch, dass, wie Charrin<sup>3)</sup> angibt, der Harn Ikterischer bei intestinaler Antisepsis an Giftigkeit verliert.

Verminderte Giftigkeit des Harns sah Gönner bei Schwangeren und Christiansen bei Geisteskranken, während Stefani bei diesen grosse Unregelmässigkeit in der Ausscheidung toxischer Stoffe im Urin, deren Wirkung er genauer analysierte, fand. Experimentell erreichte Marcantonio<sup>4)</sup> eine Herabsetzung der Hargiftigkeit bei Hunden durch Milzexstirpation.

Die Giftwirkung des Harns, wie sie nach Bouchard ermittelt wird, setzt sich aus einer Reihe von Komponenten zusammen. Die intravenöse Injektion grosser Flüssigkeitsmengen, selbst wenn sie dem Blutserum isotonisch sind, wirkt schädlich, namentlich wenn der Einfluss schnell erfolgt, und Bouchard injiziert 15–20 ccm pro Minute (Albu). Von grösserer Bedeutung ist die Anisotonie des Harns im Vergleich zum Blut des Versuchstiers (Hymans v. d. Bergh, Claude und Balthazard, Quinton<sup>5)</sup> u. a.). Diesen Faktor der „Osmotoxizität“ auszuschliessen, bereitet experimentelle Schwierigkeiten. Verdünnt man den meist hypertonen Urin bis auf eine Konzentration, bei welcher der Gefrierpunkt des Harns gleich dem des Kaninchenserums

<sup>1)</sup> V. Feltz und P. Ehrmann, *Comptes rendus* **102**. 880. 1886; **104**. 1877. 1887. — V. de Meis und C. Parascandolo, *Gazz. d. Ospedali* **1898**. 676, zit. nach *Jahresb. f. Tierch.* **28**. 681. — A. Brugnola, *Ann. d. fac. di med. dell' Univ. di Perugia* **11**. H. 2. 1899, zit. nach *Jahresb. f. Tierch.* **29**. 817. — Lannelongue und Gaillard, *Compt. rend. Acad. d. Sc.* **128**. 1493. 1899. — Mariotti-Bianchi, *Il Morgagni* **1900**. Nr. 6, zit. nach *Jahresb. f. Tierch.* **31**. 831. — Lannelongue, *Bull. de l'Acad. d. méd. d. Paris* (3) **57**. 691, zit. nach *Jahresb. f. Tierch.* **37**. 835. — Th. Lukin, *Petersburger med. Wochenschr.* 1898. Beil. S. 66, zit. nach *Jahresb. f. Tierch.* **28**. 682.

<sup>2)</sup> Lépine und Aubert, a. a. O.

<sup>3)</sup> Charrin, *Journ. de Chim. et de Pharm.* **16**. 241. 1887; *Arch. d. Pharm.* (3) **25**. 1027.

<sup>4)</sup> A. Gönner, *Zentralbl. f. Gynäkol.* **25**. 837. 1901. — V. Christiansen, *Diss. Kopenhagen* 1898, zit. nach *Jahresb. f. Tierch.* **29**. 850. — U. Stefani, *Rivista sperimentale di freniatria* 1900, zit. nach *Jahresb. f. Tierch.* **30**. 875. — Marcantonio, *Clinica med. italiana* 1900. Nr. 2, zit. nach *Jahresb. f. Tierch.* **30**. 911.

<sup>5)</sup> A. Albu, *Virch. Arch.* **166**. 77. 1901. — A. Hymans van den Bergh, *Zeitschr. f. klin. Med.* **35**. 53. 1898. — H. Claude et Balthazard, *Compt. rend. Soc. Biol.* **52**. 524. 1900 und *Journ. d. physiol.* **1**. 495. 1899. — R. Quinton, *Compt. rend. Soc. Biol.* **52**. 563 u. 607. 1900.



ist, so wird einmal die Flüssigkeitsmenge stark vermehrt, und ausserdem wird bei der osmotischen Sonderstellung des Harnstoffs gegenüber den Blutkörperchen eine solche nach der kryoskopischen Methode isotonisch gemachte Harnlösung sich den Blutkörperchen gegenüber nicht isotonisch erweisen. Claude und Balthazard haben deshalb versucht, experimentell zu bestimmen, bei welcher Verdünnung der Urin, stets auf die gleiche Menge des unverdünnten Harns berechnet, die geringste Giftigkeit zeigt. Sie nehmen an, dass an diesen Punkt weder die Hypertonie noch die Hypotonie der Lösung als schädliche Komponente sich zu der wirklichen chemischen Giftwirkung des Harns hinzugeselle. Das Minimum der Giftwirkung oder der Ausschluss der Osmotoxizität war durchschnittlich dann erreicht, wenn  $\Delta$  zwischen 0,55 und 0,56<sup>0</sup> lag. Aus ihren Versuchen berechneten sie eine empirische Formel, nach der sie die chemische Giftwirkung aus der Gesamtgiftwirkung ableiteten, und fanden für einen normalen Menschenharn (1 Toxie = 40 ccm), dass etwa 24 % der Gesamttoxizität durch die Osmotoxizität bedingt war. — Bei Anwendung dieser Berechnung, die annähernd richtige Resultate geben soll, lässt sich die Verdünnung des Harns mit ihren schädlichen Einflüssen vermeiden. Prinzipiell unrichtig erscheint es mir, die intravenöse Injektion durch die subkutane zu ersetzen. Man vermeidet dann zwar den Fehler der Osmotoxizität (Charrin, Posner und Vertun<sup>1)</sup>), aber man übersieht die Giftwirkung der Substanzen, die überhaupt oder wenigstens in den geringen Mengen, die im Harn davon vorhanden sind, nur von der Blutbahn aus wirksam sind.

Unter den Substanzen, welche die chemische Giftwirkung des Harns bedingen, spielen die Kalisalze eine grosse Rolle. So erklärt sich wohl auch die erwähnte, wesentlich höhere Giftigkeit des Harns der Pflanzenfresser.

Es hat sich aber doch herausgestellt, dass die Giftigkeit des Harns zu seinem Gehalt an Kali in keinem einfachen Verhältnis steht, dass der Harn giftiger ist als die Harnasche, und dass vom Kali befreiter Harn nach Schiffer, sowie nach Charrin und Roger<sup>2)</sup> noch giftig ist.

Von der Giftigkeit des Tagharns entfällt nach Bouehard  $\frac{1}{3}$ , von der des Nachtharns  $\frac{1}{3}$  auf das Kali. Nach Charrin und Roger beruht beim Harn des Menschen die Giftigkeit zu höchstens 45 % auf der Wirkung des Kalis, beim Kaninchenharn zu 75—80 %, beim Harn des Meerschweinchens zu 71—80 %, bei dem

<sup>1)</sup> A. Charrin, Compt. rend. Soc. Biol. 52. 587. 1900. — C. Posner und M. Vertun, Berliner klin. Wochenschr. 1900. S. 75.

<sup>2)</sup> Schiffer, Du Bois' Arch. 1883. S. 127; Deutsche med. Wochenschr. 1883. S. 229; Verhandl. des 3. Kongresses f. innere Med. 1883/84. S. 13. — Charrin und Roger, Comptes rendus de la Soc. de Biol. 1886. S. 607; Jahresber. f. Tierchem. 16. S. 489 u. a. a. O.

des Hundes zu 71 %. Nach einer Berechnung von Singer<sup>1)</sup> kommen beim Menschen 46 %, beim Kaninchen 73 % des urotoxischen Koeffizienten durchschnittlich auf die Kaliwirkung.

Wenn man nach Lépine und Aubert vom normalen Harn 60 ccm braucht, um einen Hund zu töten, braucht man dazu für einen Hund gleicher Grösse und gleicher Rasse die Asche von 65 ccm desselben Harns. Vom Harn Fiebernder entsprechen 25 ccm der Asche aus 40 ccm desselben Harns.

Ausser den Kaliumsalzen sind vermutlich noch eine Reihe von normalen anorganischen und organischen Harnbestandteilen an der Giftwirkung beteiligt. Von einigen, wie dem Methyl- und dem Dimethylguanidin, dem Methylpyridylammoniumhydroxyd, dem Carnitin (Novain) bzw. seinen Abkömmlingen und dem Körper von Pouchet, ist dies in den betreffenden Kapiteln besonders hervorgehoben.

Einige qualitative Nachweisversuche lassen es auch zum mindesten möglich erscheinen, dass geringe Mengen von Adrenalin im normalen Harn sich finden (Schur), doch ist der Beweis für den Übergang von Adrenalin in den Harn noch nicht erbracht. Auch das Vorkommen von Substanzen, die beim enukleierten Froschauge die Pupille erweitern, kann vielleicht, aber muss nicht auf die Anwesenheit von Adrenalin zurückgeführt werden (Diem<sup>2)</sup>).

Den Hauptanteil an der Giftwirkung dürften Substanzen haben, deren chemische Natur noch nicht aufgeklärt ist.

Nach den Bestimmungen von Billard und Perrin<sup>3)</sup> erniedrigen die Harngifte die Oberflächenspannung des Harns. Sie fanden ganz regelmässig bei allen untersuchten Harnen, dass die Harnе mit grösserer Oberflächenspannung weniger giftig sind als die mit geringerer. Die folgende Tabelle aus Perrins Arbeit gibt einen Überblick über ihre Beobachtungen an Harnen von gesunden und kranken Menschen:

Oberflächenspannung	1 Urotoxie entspricht ccm Harn
5,76	13
5,88	17
6,02	20
6,15	27
6,22	34
6,34	40
6,49	45
6,60	48
6,88	53
7,09	81
7,13	88
7,25	96
7,41	164

<sup>1)</sup> H. Singer, Arch. internat. de pharmacodyn. 8. 221. 1901; dort Lit.

<sup>2)</sup> Schur, Wiener klin. Wochenschr. 1909. Nr. 46. — M. Diem, Deutsch. Arch. f. klin. Med. 94. 174. 1908.

<sup>3)</sup> G. Billard et Perrin, Compt. rend. Soc. Biol. 58. 55. 1905 und G. Perrin, Relation entre la tension superficielle des urines et leur toxicité. Thèse de Lyon 1906.

Im folgenden sollen die bisher unternommenen Versuche zur Isolierung der giftigen Substanzen einzeln beschrieben werden. Diese Versuche lassen bereits den Schluss zu, dass sich sowohl unter den nicht dialysablen wie unter den dialysablen Harnbestandteilen solche mit Giftwirkung finden. Inwieweit bei der Wirkung der nicht dialysierenden Substanzen die im Harn nachgewiesenen Fermente eine Rolle spielen, ist noch nicht untersucht. Die Beobachtung von Bouchard, Balthazard und Camus<sup>1)</sup>, dass durch Erhitzen auf 57° die Giftigkeit des Harns auf fast  $\frac{1}{3}$  herabgesetzt wird, zeigt, dass jedenfalls thermolabile Substanzen sich unter den Harngiften befinden.

Mme. Eliacheff hat zuerst darauf hingewiesen, dass der nicht dialysable Anteil aus normalem Harn Giftwirkungen entfalte. Wenn Sasaki die nicht dialysablen Stoffe sehr viel weniger giftig fand, so kann das an kleinen Änderungen der Darstellungsmethode liegen. Sasaki fällte den eingeeengten Harn vor der Dialyse mit Kalkhydrat und Chlorcalcium, wobei kolloide Stoffe mit in den Niederschlag gerissen sein können. Die Erfahrungen von Bergmann, Savarè (bei Eklampsieharnen), Marino Zuco, Geelhorn, Abelous und Bardier („Urohypotensin“) bestätigen, dass den nicht dialysablen Bestandteilen Giftwirkungen zukommen. Bis zu einem gewissen Grade gilt das auch für die Beobachtungen von Mairet und Bosc, welche die Harnfarbstoffe als die ausschliesslichen Träger der Giftwirkungen ansprechen, ohne auszuschliessen, dass die Giftstoffe jenen nur beigegeben waren, und für den Befund von Bénech, dass Tierkohle einen erheblichen, aber wechselnden Anteil der Giftstoffe zurückhält. Unter den nicht dialysablen Stoffen wird man bei Infektionskrankheiten auch sogenannte Toxalbumine parasitärer Herkunft finden. So beschreibt Dorland im Harn eines an Orchitis Erkrankten eine solche eiweissartige Substanz, die aus dem dialysierten Harn mit Alkohol gefällt wurde und, in den Hoden eines Hundes injiziert, Orchitis hervorrief. Diphtherietoxin dagegen ist nach intravenöser Injektion bei Tieren im Harn nach Cobbet und Kanthack nicht nachzuweisen. Auch die von Schattenfroh<sup>2)</sup> beobachteten „lysogenen“ Stoffe des Harns sowie das von H. Pfeiffer nachgewiesene Harnagglutinin sind nicht dialysabel.

<sup>1)</sup> Ch. Bouchard, Balthazard et J. Camus, *Compt. rend. Acad. d. Sciences* **147**. 208. 1908.

<sup>2)</sup> P. Eliacheff, *Mém. de la Soc. de Biol.* (9) **3**. 71. 1891 und Thèse de Paris 1905. — K. Sasaki, *Hofmeisters Beitr.* **9**. 392. 1907. — E. Bénech, *Compt. rend. Soc. Biol.* **52**. 805. 1900. — A. Dorland, *Compt. rend. Soc. Biol.* **54**. 594. 1902. — H. Cobbet u. A. A. Kanthack, *Zentralbl. f. Bakteriologie* **24**. 129. 1898. — A. Schattenfroh, *Ztschr. f. Hygiene u. Infektionskr.* **44**. 339. 1902.

Andererseits haben eine Reihe von Forschern<sup>1)</sup> (Selmi, Bouchard, Gardeur, Dresbach, Guillemard und Vranceanu, Abelous und Bardier u. a.) mit Verfahren, die zur Isolierung von Alkaloiden verwendet werden, giftige Substanzen von zum Teil recht charakteristischen Wirkungen erhalten, und H. Pfeiffer sah die lokale, nekrotisierende und die neurotoxische Wirkung der alkohollöslichen Rückstände des im Vakuum bei 40° eingedampften Harns bei der Dialyse durch Pergament verschwinden. Guillemard und Vranceanu berechnen aus ihren Versuchen, dass ungefähr  $\frac{1}{5}$ — $\frac{1}{4}$  der Gesamtoxicität auf die „Alkaloidgiftigkeit“ kommt. Das durch die Alkaloide bewirkte Vergiftungsbild war ungefähr das gleiche wie das nach der Injektion des Gesamtharns, es wechselte aber bei verschiedenen normalen Harnen, was auf verschiedenartige Zusammensetzung der Alkaloide zurückgeführt wird.

Abelous und Bardier endlich beschrieben sowohl pressorisch als depressorisch wirkende Substanzen im Urin, die mit Alkohol extrahiert werden können, nicht dialysieren, und beim Schütteln mit Äther in dieses Lösungsmittel gehen.

## B. Beschreibung einzelner Darstellungsversuche.

### a) Substanzen kolloidalen Charakters.

1. Mairet und Bosc<sup>2)</sup> verfahren zur Darstellung der Harnfarbstoffe in folgender Weise. Der Harn wird mit Bleiessig ausgefällt, der Niederschlag auf dem Filter mit Wasser gewaschen und darauf in der Kälte so oft mit essigsäurehaltigem Äther behandelt, als dieser noch Farbstoff aufnimmt. Das in Lösung gegangene Blei wird durch Schwefelwasserstoff entfernt, das Schwefelblei wieder mit der Mischung von Essigsäure und Äther gewaschen. Die Lösung wird dann auf dem Wasserbad zur Trockne verdunstet. Um die geringe Menge Farbstoff zu gewinnen, welche der Fällung mit dem Bleiacetat entgeht, wird das gelbe Filtrat mit Tierkohle entfärbt, die Kohle einige Male mit Wasser gewaschen und ihr der Farbstoff durch die möglich geringste Menge Natriumcarbonat entzogen. Das Filtrat vom Bleiniederschlag scheidet ausserdem noch ein goldgelbes Urat ab, welchem der Farbstoff durch essigsäurehaltigen Äther entzogen wird. Die Mischung der drei Präparate in wässriger Lösung reagiert neutral, besitzt die Farbe und den Geruch des Harns, enthält nur Spuren Harnstoff und Harnsäure und an Mineralsubstanz (Chloride, Sulfate, Phosphate) 0,1 %. Die Lösung des Farbstoffes aus 150 cem Harn tötet ein Kaninchen ganz unter denselben Erscheinungen wie der Harn selbst. Enthielte der ätherische Auszug auch die Alkaloide des Harns, so können sie nach Mairet und Bosc doch nur in so geringer Menge vorhanden sein, dass ihnen die Giftwirkung nicht zuzuschreiben ist.

<sup>1)</sup> Literaturangaben s. unter B und C.

<sup>2)</sup> Mairet und Bosc, Compt. rend. Soc. Biol. (9) 3. 94. 1891; Zentralbl. f. Physiol. 5. 140.



2. Mme. Eliacheff<sup>1)</sup> bediente sich zum Aufsuchen von Ptomainen im Harn der Dialyse.

Der Harn wurde jeden Tag im Vacuum bei 35—37° auf  $\frac{1}{10}$  seines Volums eingedampft, dann mit einigen Tropfen Blausäure versetzt. Die gewonnenen 4,2 Liter eingedampfter Harn wurden 11 Tage lang dialysiert und die Fäulnis durch Zusatz von Blausäure oder Schwefelkohlenstoff zur Innen- und Aussenflüssigkeit hintangehalten. Als nichts mehr in die Aussenflüssigkeit überging, wurde die Innenflüssigkeit wieder nahe bei Körpertemperatur im Vacuum bis zum Sirup eingengt und in der Kälte vollends getrocknet. Alle Operationen wurden, mit Ausnahme des Eindampfens, nahe bei 0° vorgenommen, weil sich sonst die Flüssigkeit mit Schimmel bedeckte.

Der nicht dialysierbare Anteil aus normalem Harn wog 5,8 g (138 mg auf das Liter, 193 mg für 24 Stunden), war glasig, durchscheinend, sehr hart, dunkelbraun mit Perlglanz, sehr hygroskopisch, sehr leicht löslich in Wasser, wenig in Alkohol und in Äther, reagierte deutlich sauer, reduzierte in der Kälte Goldchlorid, Platinchlorid, Sublimat, Silbernitrat, gab aber mit Eisenchlorid und Ferricyanalkalium kein Berlinerblau; Tannin rief einen flockigen, graulich weissen Niederschlag hervor. Die Substanz enthielt nur Spuren Mineralbestandteile und gab bei der Analyse 60,75% C, 9,37 H, 10,94 N, 12,54 O, 3,00 P, 3,40 S, woraus Mme. Eliacheff die Formel  $C_{52}H_{96}N_8O_8PS$  ableitet, oder, mit Weglassung von P und S:  $C_{13}H_{24}N_2O_2$ . Von der Substanz war 0,1 g intravenös für ein Kaninchen nicht tödlich, aber 0,25 g töteten ein Kaninchen von 2,2 kg in 18 Stunden. Injektion von 0,1 g ist beim Menschen von geringem Unwohlsein (leichtem Kopfschmerz) gefolgt.

In derselben Weise wurde der Harn von zwei fieberfreien Tuberkulösen durch 7 Tage verarbeitet. Der nicht dialysierbare Teil betrug für 24 Stunden 180 mg. Die Substanz besass dieselben Eigenschaften wie die aus normalem Harn und enthielt, wie diese, gleichfalls P und S. Die Kranken wurden mit Kochschem Tuberkulin behandelt, worauf Fieber eintrat; der Harn blieb aber eiweissfrei. Der während des Fiebers entleerte Harn lieferte für 24 Stunden 234 mg nicht dialysierbare Substanz von derselben Beschaffenheit wie die aus normalem Harn; dieselbe bestand aber aus 55,59% C, 8,26 H, 13,88 N, 15,87 O, 3,00 P, 3,40 S, ohne Berücksichtigung des P und S =  $C_{14}H_{25}N_3O_3$ . In der auf die Injektionen folgenden fieberfreien Zeit wurde in 24 Stunden 143 mg nicht Dialysierbares ausgeschieden. Es besass die Eigenschaften und die Zusammensetzung wie das aus normalem Harn. Vor der Injektion des Tuberkulins und in den fieberfreien Zeiten nach derselben war die Substanz in demselben Grade giftig, wie die aus normalem Harn; von während des Fiebers abgesonderter Substanz tötete dagegen 0,1 g ein Kaninchen in 45 Minuten unter denselben (asphyktischen) Erscheinungen, wie der Harn selbst. Injektion von 0,1 g dieser Substanz bewirkt bei Menschen etwas Fieber, Frösteln, ziemlich stark anhaltende Kopfschmerzen, Steifigkeit, beschleunigten Puls, Appetitlosigkeit.

Allem Anscheine nach bestand diese nicht dialysierbare Substanz vorwiegend aus einem Gemenge von Nucleoalbumin und Chondroalbumin (vgl. die mucinähnliche Substanz).

3. Bergman<sup>2)</sup> fällte aus dem dialysierten Harn von gesunden Männern die Eiweisskörper entweder nach vorhergehender Konzentration bei mässiger Tem-

<sup>1)</sup> Mme. P. Eliacheff, Mémoires de la Soc. de Biol. (9) 3. 71. 1891; Zentralbl. f. Physiol. 5. 606.

<sup>2)</sup> P. Bergman, Verh. der Sect. f. med. Chem. der Vers. nordischer Naturforscher u. Ärzte in Helsingfors 1902, zit. nach Jahresb. f. Tierch., 32. 821.

peratur durch absoluten Alkohol oder nach der Methode von K. Mörner (s. nicht dialysable Stoffe des Harns). Die Lösung des Niederschlages wirkt stark giftig auf Kaninchen und Frösche. — Nach der Fällung des Harneweisses wurden vom Trockenrückstand des Filtrats des dialysierten Harns Wasser-, Alkohol- und Ätherextrakte hergestellt. In den Lösungen waren Substanzen mit ausgeprägter Kurarewirkung, solche, die die Erregbarkeit des Muskels in hohem Grade erhöhen, und solche, die eine zentral lähmende Wirkung ausüben, ohne die periphere Erregbarkeit zu schädigen.

4. Marino Zuco<sup>1)</sup> isolierte eine „Biotoxin“ genannte Substanz von starken Giftwirkungen auf folgendem Wege: 50 Liter normalen Menschenharn wurden nach Filtration durch Pukallfilter unter streng aseptischen Kautelen (Versuchsanordnung s. im Original) bei 38° im Vacuum zu etwa 1½ Liter Sirup eingengt. Dieser Sirup wurde in dünnem Strahl in das siebenfache Volum Alkohol von 90° gegossen. Nach häufigem Umschütteln wurde ein unlöslicher Teil in Form eines flockigen Magma von gelbroter Farbe erhalten, das bald teilweise krystallinisch wurde, und eine wässrig-alkoholische Lösung von tiefroter Farbe. Die klar gewordene Flüssigkeit wurde abgehebert, der Niederschlag von neuem mit Alkohol von 85° geschüttelt und diese Prozedur drei- oder viermal wiederholt, bis die überstehende Flüssigkeit nahezu farblos war. Der Niederschlag wurde abgesaugt und mit neuem Alkohol gewaschen. Die Behandlung von der Alkoholfällung bis zum Absaugen muss möglichst schnell vorgenommen werden, damit das Toxin nicht an Giftigkeit einbüsst. — Der Niederschlag wurde im Vacuum getrocknet, mit ungefähr dem gleichen Volum sterilem, destilliertem Wasser verrieben, damit 12 Stunden in der Kälte stehen gelassen und in einem sterilen Vacuum-Filtrationsapparat filtriert. Die wässrige filtrierte Lösung wurde in einem mit Thymolwasser sterilisierten Dialysator unter Einhaltung strengster Antisepsis etwa 10—15 Tage dialysiert, bis das Aussenwasser keine Phosphatreaktion mit Ammoniummolybdat mehr gab. Das ebenfalls mit Thymol versetzte Aussenwasser wurde täglich gewechselt.

Die dialysierte Flüssigkeit wurde nochmals im Vacuum steril auf ein kleines Volum eingengt, mit dem fünffachen Volum Alkohol von 90° gefällt und der flockige Niederschlag wie oben behandelt. Der mit Alkohol gewaschene, im Vacuum getrocknete Rückstand wurde in möglichst wenig Wasser aufgenommen und schliesslich mit Alkohol von 96° gefällt. Wenn die wässrige Flüssigkeit genügend gereinigt und namentlich vollkommen salzfrei geworden war, blieb bei der Alkoholfällung das Toxin in Form einer kaum opaleszierenden Flüssigkeit gelöst, aber auf Zusatz einer kleinen Menge Kochsalz wurde es als flockiger Niederschlag erhalten. Die Menge des amorphen, vollkommen weissen, in Alkohol unlöslichen Pulvers, die so erhalten wurde, betrug 0,3—0,5 g pro Liter Urin.

Die Substanz bleibt in trockner Luft unverändert, an feuchter Luft wird sie braun und büsst dann von ihrer Giftigkeit ein. Sie enthält Stickstoff, Schwefel und Phosphor und gibt die Liebermannsche und die Xanthoprotein-Reaktion der Eiweisskörper. Eine fermentative Wirkung konnte nicht nachgewiesen werden. Auch im Harn von Carnivoren und Herbivoren findet sie sich in annähernd gleicher Menge.

Die Giftwirkung des Toxins beschreibt Onorato<sup>2)</sup> folgendermassen: Schon 1 mg tötet bei subkutaner Injektion ein Meerschweinchen im Verlauf von mehr als 1 Monat. Die Wirkung ist vorwiegend lähmend oder krampferregend, je nach der angewandten Dose. Schliesslich tritt stets ein komatöser Zustand ein. Ausgesprochen ist die Wirkung auf die Körpertemperatur: hohe Dosen (0,2 g) setzen sie sofort stark herab, mittlere Dosen (0,05—0,1 g) erhöhen die Temperatur anfangs, später sinkt sie, und es tritt Kollaps und Tod ein. Pathologisch-anatomisch

<sup>1)</sup> F. Marino Zuco, *Archivio di fisiologia* 1. 513 1904. — F. Marino Zuco e R. Onorato, ebenda 2. 389. 1905.

<sup>2)</sup> R. Onorato, *Archivio di fisiologia* 1. 534. 1904.

sind sulziges Ödem, das von der Injektionsstelle ausgeht, Kongestion der inneren Organe, ganz besonders der Nebennierenrinde und parenchymatöse Nephritis festgestellt.

Im Urin von Nephritikern fanden Marino Zucco und Onorato das Biotoxin in verminderter Menge. Sie halten es deshalb für wahrscheinlich, dass es bei Nephritikern im Körper zurückgehalten wird und die Symptome der Urämie veranlasst.

5. Savarè<sup>1)</sup> dialysierte Harn in Schilfschläuchen nach dem von Sasaki ausgearbeiteten Verfahren der „Schütteldialyse“ 24 Stunden lang. (Genauerer s. im Kap. „Nicht dialysable Substanzen“.) Zur möglichst vollständigen Entfernung von Eiweiss wurde der Harn mit 2 Vol. Alkohol bei saurer Reaktion versetzt und einige Stunden auf dem siedenden Wasserbad stehen gelassen. Das Filtrat vom Koagulum nebst Waschwasser wurde im Vacuum bei niedriger Temperatur auf ein kleines Volum gebracht und dialysiert. Im Vergleich mit normalen Harnen lieferte der Harn Ekklampischer sehr viel grössere Mengen adialysabler Stoffe: zwischen 2,25 und 13,84 g statt 0,44—0,6 g im Liter. Der Eiweissgehalt des ursprünglichen Harns war dabei nicht von Bedeutung. Das chemische Verhalten wich ebenfalls gegen das der Substanzen aus normalem Harn etwas ab. Der Rückstand verbrannte auf dem Platinblech ohne Karamelgeruch, gab deutliche Millonsche und Schwefelblei-Probe, schwache Xanthoprotein- und Adamkiewiczsche Reaktion. Phosphor schien reichlicher als sonst vorhanden. Die Probe auf Chondroitinschwefelsäure mit Eiweiss war eben nur angedeutet. Vielleicht wird die Chondroitinschwefelsäure bei der Eiweisskoagulation, die in saurer Lösung erfolgen muss, mit entfernt.

Das im nicht dialysablen Rückstand enthaltene Stoffigemenge zeigte stets Giftwirkungen; ungefähr 0,06 g töteten ein Kaninchen im Gewicht von 1500 g. Die Tiere verfielen in einen soporösen Zustand, dann in klonisch-tonische Krämpfe von wechselnder Dauer, es folgte Paralyse der hinteren Körperhälfte, heftige Dyspnoe, Mydriasis, Koma. Manchmal wiederholten sich die Krampfanfälle, bis der Tod unter Erscheinungen von Asphyxie eintrat. Der Verlauf der Vergiftung währte etwa 2—12 Stunden. In den nicht tödlichen Fällen erfolgte die Erholung nur langsam. Die Autopsie ergab zahlreiche Ekchymosen in Pleura, Perikard und Endokard, kleine parenchymatöse Blutungen in Thymus, Leber und Nieren.

Im Harn Tuberkulöser wurde eine Substanz von gleicher chemischer Beschaffenheit und physiologischer Wirkung gefunden.

Früher hatten Charrin und Le Noir<sup>2)</sup>, als sie den löslichen Anteil mit Alkohol gefällten Harns von fiebernden Tuberkulösen Kaninchen subkutan injizierten, Gefässerweiterung eintreten sehen.

6. Wird Harn mit Bleiacetat gefällt, im Filtrat das überschüssige Blei mit konzentrierter Natriumphosphatlösung entfernt, das Filtrat vom Bleiphosphat im hohen Vacuum eingengt und das eingengte Filtrat wiederholt im Eisschrank gegen destilliertes Wasser dialysiert, so enthält die Dialysatorflüssigkeit eine giftige Substanz von den Eigenschaften des Weichardtschen Kenotoxins oder Eiweissabspaltungsprodukts von Ermüdungstoxincharakter. Dieses Toxin wird ausser durch seine physiologische Wirkung hauptsächlich dadurch charakterisiert, dass es bei Tieren, die das Antitoxin erhalten haben, nicht wirkt, dass es also durch einen — allerdings nicht streng spezifischen — Antikörper abgesättigt werden kann. Weichardt fand das „Kenotoxin“ im Harn von Säugetieren und namentlich in den Exkrementen gut fliegender Vögel, Gellhorn<sup>3)</sup> auch in dem Dialysierrückstand des schwach angesäuerten Harns von magendarmkranken Säuglingen mit einem bestimmten Symptomenkomplex.

<sup>1)</sup> M. Savarè, Hofmeisters Beitr. 9. 401. 1907 und 11. 71. 1907.

<sup>2)</sup> Charrin und Le Noir, Compt. rend. Soc. Biol. (9) 5. 769. 1893.

<sup>3)</sup> W. Weichardt, Zentralbl. f. Bakteriologie. 43. 312. 1907. — W. Gellhorn, Münch. med. Wochenschr. 1908. S. 845.



7. Abelous und Bardier<sup>1)</sup> isolierten aus normalem Menschenharn eine Substanz (oder Substanzen), der sie den Namen „Urohypotensin“ beilegen, auf folgende Weise: 4 oder 5 Liter Urin werden auf ein Volum von 500 bis 600 ccm eingedickt. Die durch Ausscheidung von Erdalkalisalzen trübe Flüssigkeit wird mit dem zehnfachen Volum Alkohol von 95° gefällt und nach 24 stündigem Stehen der Alkohol abfiltriert. Der lufttrockne Filtterrückstand wird mit einem kleinen Volum Wasser aufgenommen und die Lösung unter Thymolzusatz 48 Stunden gegen fließendes Wasser dialysiert. Die dialysierte Flüssigkeit wird mit dem zehnfachen Volum absolutem Alkohol gefällt. Der Niederschlag wird gesammelt und im Vacuum bei niedriger Temperatur getrocknet. Man erhält so 0,5—0,6 g eines weissen, wasserlöslichen Pulvers, das die Reaktionen einer Albumose gibt. Die Lösungen werden durch Kochen im allgemeinen nicht koaguliert, geben aber zuweilen bei 60—65° eine leichte Trübung.

Man kann die wirksame Substanz auch durch Sättigen des Urins mit Ammonsulfat, Auswaschen des Niederschlags mit gesättigter Ammonsulfatlösung und absolutem Alkohol (zur Entfernung des Urobilins) erhalten. Der Niederschlag wird dialysiert und die dialysierte Lösung wie oben mit absolutem Alkohol gefällt.

Das „Urohypotensin“ bewirkt nach Injektion einiger Zentigramme in die Vene eines Kaninchens oder Hundes eine Verengung der Pupille bis zur Punktform, die 15—25 Minuten anhält und wahrscheinlich auf einer peripheren Okulomotoriusreizung beruht. Gleichzeitig tritt Hyperämie der Ohr- und Konjunktivalgefäße von kurzer Dauer, eine eigentümliche Stumpfheit bei erhaltener Sensibilität, Verlangsamung der Respiration und Temperaturemniedrigung ein. Weitere Symptome sind Tränensekretion und Speichelfluss, ein Symptom, das nach Injektion des Urins im ganzen von Charrin und Mavrojannis<sup>2)</sup> schon lange beobachtet war, beim Hunde auch Erbrechen. Der Blutdruck sinkt beim Hund um 60 bis 100 mm Hg. Die Blutdrucksenkung ist eine periphere Wirkung, sie beruht wahrscheinlich auf einer Vasodilatatore-Reizung, die namentlich an den Gehirngefäßen sich manifestiert. Die Tiere gehen meist nach scheinbarer Wiederherstellung unter Abmagerung und Erscheinungen einer parenchymatösen Nephritis nach einigen Tagen zugrunde. Bei Injektion von 10—15 cg pro Kilo sterben die Tiere nach etwa 2 Stunden im Coma. Bei noch höheren Dosen treten kurzdauernde Krampfanfälle auf, die nicht auf intravasculäre Gerinnungen zurückzuführen sind. — Bei der Sektion findet man Kongestion der Lungengefäße mit Infarkten, starke Hyperämie der Hirngefäße, eventuell Nephritis.

Erhitzt man die Lösungen von Urohypotensin einige Minuten auf 110—120°, oder schüttelt man sie mit Tierkohle, so verlieren sie ihre Wirkung. Kurzes Aufkochen ändert die Wirksamkeit nicht merklich.

Abelous und Bardier<sup>3)</sup> glauben einen wesentlichen Teil der urämischen Symptome beim Menschen auf die Zurückhaltung des Urohypotensins zurückführen zu dürfen.

Nach Pearce<sup>4)</sup> verursacht die Injektion von 3 ccm Hundeurin in die Venen eines anderen Hundes bei diesem sofortiges Sinken des Blutdrucks. Diese Wirkung des normalen Harns fehlt oft den Harnen von Hunden mit Läsionen der Nierentubuli (Chromat- und Urannephritis), während bei Läsionen der Glomeruli (Arsen- und Kantharidinnephritis) die depressorisch wirkende Substanz im Harn erscheinen soll (vgl. dazu

<sup>1)</sup> J. E. Abelous et E. Bardier, Journ. de physiol. et de path. gén. **11**. 777. 1909.

<sup>2)</sup> Mavrojannis, Compt. rend. Soc. Biol. **50**. 638. 1898. — Charrin, Diskussionsbemerkung.

<sup>3)</sup> Abelous und Bardier, Compt. rend. Soc. Biol. **69**. 121. 1910.

<sup>4)</sup> R. M. Pearce, Proc. Soc. exper. biol. and med. New York **6**. 129. 1909.



die Beobachtungen von Marino Zuco und Onorato über die verminderte Ausscheidung ihres „Biotoxins“ bei Nephritikern, S. 732).

### b) Substanzen von Alkaloid-Charakter.

1. Selmi<sup>1)</sup> hat aus pathologischen Harnen bereits 1880 eine Anzahl Basen dargestellt.

Die Untersuchungen betrafen je einen Fall von progressiver Paralyse (zweimalige Untersuchung), von infektiöser Pneumonie mit Albuminurie, Icterus und zwei Fälle von Ileotyphus.

Der Harn wurde mit Baryumhydrat schwach alkalisch gemacht, mit absolutem Alkohol vollständig gefällt und vom schwach alkalischen Filtrat der Alkohol im Kohlensäurestrom abdestilliert. Das Destillat enthielt in fünf Fällen einen neutralen, phosphorhaltigen Körper und eine Basis, die als Chlorhydrat dargestellt wurde. Der Destillationsrückstand wurde mit Baryumhydrat alkalisch gemacht, mit Äther ausgeschüttelt und die in Lösung gegangene Basis gleichfalls an Salzsäure gebunden.

Keine der gewonnenen Basen stimmte mit einer anderen in den Reaktionen überein. Bei der gleichen Methode gewonnene Basen waren giftig und nicht giftig. Sie rochen nach Nikotin, Coniin, faulen Fischen oder ammoniakartig; eine derselben nennt Selmi wegen ihres Nikotingeruchs Pseudonikotin. Die Chloride der mit Alkohol flüchtigen Basen krystallisierten zum Teil und waren zum Teil zerfliesslich. Mit Platinchlorid gab eine keinen Niederschlag, die anderen Oktaeder oder Dodekaeder, eine gekreuzte Krystalle. Goldchlorid gab nichts, oder Trübung, oder Oktaeder, oder gelbe Prismen. Sublimat gab einmal einen weissen amorphen Niederschlag, einmal kurze Prismen. Jodjodwasserstoff lieferte einmal einen ziegelroten Niederschlag, einmal einen braunen amorphen, sonst braune Plättchen oder Nadeln, einmal stahlgraue Krystalle. Jodwismuthkalium gab mennig- oder zinnoberrote Niederschläge, einmal Nadeln. Nesslerisches Reagens fällte gelb, Pikrinsäure gab nichts oder gelbe amorphe und krystallinische Niederschläge, Tannin Trübung. Phosphorwolframsaures Natron fällte nicht.

Die Reaktionen der aus dem Destillationsrückstand gewonnenen Basen waren nicht minder mannigfaltig als die der anderen. Selmi behauptet nicht, dass jede der aufgefundenen Basen ein chemisches Individuum gewesen sei. Mit Mono-, Di- oder Trimethylamin sowie mit Propylamin waren sie nicht identisch. Er nennt sie Pathoamine.

Die zunächst folgenden Untersuchungen des Harns sind in der Weise ausgeführt worden, dass der alkalisch gemachte Harn mit Äther ausgeschüttet wurde, also nach demselben Prinzip, nach welchem, nach Stas-Otto, bei Vergiftungsfällen die Alkaloide aufgesucht werden.

2. Bouchard<sup>2)</sup> wies auf diese Art im normalen Harn einen in Äther und einen zweiten, nicht in Äther, aber in Chloroform löslichen, alkaloidartigen Körper nach.

Der normale Harn (4 Liter) wurde vor der Behandlung mit den Lösungsmitteln eingedampft. Doch war das (in Äther lösliche) Alkaloid bei der Unter-

<sup>1)</sup> Selmi, Annali di Chim. e di Farmacol. 8. 3. 1888; Chem. Zentralblatt 1888. S. 1554.

<sup>2)</sup> Ch. Bouchard, Revue de méd. 2. 825. 1882.

suchung von vier verschiedenen Harnen nur dreimal aufzufinden. Beide Alkaloide sind in sehr grosser Menge auch in frischen Stühlen (bei Gesunden, bei putrider Diarrhöe und bei Typhus) vorhanden. Die im Harn befindlichen verhalten sich gleich denen im Kot in bezug auf die Löslichkeit. Im Harn tritt um so mehr Alkaloid auf, je mehr davon der Kot in löslicher Form enthält; bei putrider Diarrhöe kommt im Harn 40—50 mal soviel vor wie normal. Von den im Kot auftretenden Substanzen gibt Bouchard an, dass sie mit Jodquecksilberkalium bald einen in der Wärme unlöslichen Niederschlag geben, bald keinen; durch Jodjodkalium werden sie reichlich gefällt. Die in Äther löslichen geben in der Regel mit Ferricyankalium und Eisenchlorid sofort Blaufärbung, die mit Chloroform extrahierten dagegen nur sehr langsam.

Aus dem mit Natron alkalisch gemachten Harn einer grossen Anzahl Fälle von Typhus, zweier Fälle von infektiöser Pneumonie, je eines Falles von Pleuritis und Ikterus, die beide infektiös waren, hat Bouchard <sup>1)</sup> durch Schütteln mit Äther basische Substanzen gewonnen, die nach dem Verdunsten des Äthers, in verdünnter Schwefelsäure gelöst, mit Jodquecksilberkalium einen gelblich oder grünlich weissen, in der Wärme löslichen und beim Erkalten wieder auftretenden, auch in Alkohol und in Äther löslichen Niederschlag gaben, ferner durch Pikrinsäure hellgelb, durch Jodjodkalium braun gefällt wurden und mit Ferricyankalium und Eisenchlorid Berliner Blau bildeten.

3. Lépine und Guérin <sup>2)</sup> gewannen eine Substanz, deren Lösung in Salzsäure sich als giftig erwies. Die Auszüge aus pathologischem Harn waren giftiger als die aus normalem, und der Auszug aus Typhusharn verhielt sich anders als der aus Pneumonieharn.

4. In ähnlicher Weise stellte Villiers <sup>3)</sup> seine Untersuchungen an.

Es wurden 1—2 Liter Harn nach dem Ansäuern erst in der Wärme, dann im Vacuum verdunstet, der Rückstand mit absolutem Alkohol ausgezogen, das Filtrat im Vacuum verdunstet, der Rückstand in wenig Wasser gelöst, mit kohlen-saurem Natron alkalisch gemacht und mit Äther geschüttelt. Dem Äther wurde die in Lösung gegangene alkalische Substanz mit salzsäurehaltigem Wasser entzogen. Die gewonnenen Stoffe gaben dann allgemeine Alkaloidreaktionen.

In seinem eigenen Harn fand Villiers 6 mal kein Alkaloid, dagegen 2 mal bei leichtem Unwohlsein. Im Harn von 9 anderen Personen, die sich für gesund hielten, war nur 2 mal Alkaloid nachweisbar. Es fand sich bei verschiedenen Krankheiten (Masern, Diphtherie, Pneumonie, Phthisis, Kopfabszess), die ohne Verabreichung von Alkaloiden behandelt wurden; bei einem Tetanus war es nicht nachweisbar.

5. Von einer gleichfalls in Äther löslichen alkaloidartigen Substanz fand Aducco <sup>4)</sup>, dass sie bei Muskeltätigkeit in vermehrter Menge ausgeschieden wurde.

Der Harn stammte von Soldaten, welche anstrengende Märsche machten. Wenn der Harn nach der Titrierung mit Natronlauge eine geringere als 0,1 % Schwefelsäure entsprechende Menge Säure enthielt, wurde er bis zu diesem Grade mit Weinsäure versetzt, dann, erst bei 35—40 °, zuletzt im Vacuum eingedampft, der Rückstand mit reinem Alkohol ausgezogen und die Lösung zur Trockne verdunstet. Der dabei bleibende Rückstand wurde mit Äther gewaschen, mit doppelt kohlen-saurem Natron alkalisch gemacht und mit Äther ausgeschüttelt. Die

<sup>1)</sup> Bouchard, Comptes rendus de la Soc. de Biol. (7) 3. 604. 1882.

<sup>2)</sup> Lépine und Guérin, Revue de méd. 1884. S. 767; Lyon méd. 42. 1884; Virchow-Hirsch's Jahresber. 1884. 1. 152 u. 212.

<sup>3)</sup> A. Villiers, Comptes rendus 100. 1246. 1885.

<sup>4)</sup> V. Aducco, Arch. de Biol. ital. 9. 203; Zentralbl. f. Physiol. 1888. S. 291.

Lösung wurde verdunstet, der Rückstand durch wiederholte Behandlung mit Salzsäure und Äther gereinigt und der Rückstand der alkalischen Ätherlösung mit ein paar Tropfen Salzsäure im Vacuum bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Der Rückstand war nicht krystallinisch. Die freie Basis reagierte stark alkalisch, roch nach frisch gemahlenem Mais oder nach Sperma und gab die gewöhnlichen Alkaloidreaktionen; mit Eisenchlorid und Ferricyankalium lieferte sie Berliner Blau. Das schwer lösliche Platinsalz enthielt 31,02 % Platin. Nach ihren Reaktionen ist die Basis weder Neurin noch Cholin.

Es wurden immer 7—20 Liter Harn in Arbeit genommen. Im Mittel aus 11 Bestimmungen wurde im Liter 5,28 mg (2,32—9,5) Chlorhydrat gefunden. Während des Marsches enthielt der Harn am meisten, vor dem Marsch und den Tag nach dem Marsch am wenigsten.

6. Luff<sup>1)</sup> hat den Harn in einem Fall von Typhus und in mehreren Fällen von Scharlach auf der Höhe des Fiebers nach der unter C. 1. beschriebenen Methode mit Erfolg untersucht; die Kranken erhielten, während der Harn gesammelt wurde, und vorher, keine Alkaloide und keine Antipyretica. Im Harn eines Typhösen vom 22. und 23. Tag mit Temperaturen bis höchstens 37,5° und im Harn Gesunder wurde nichts Derartiges gefunden. Auf die Giftigkeit der Ptomaine wurde nicht untersucht.

Typhus, Harn von vier Tagen bei 39,2—40,0°. Wenig weisse, krystallinische Substanz. Die Lösung derselben in sehr verdünnter Salzsäure gab mit Phosphormolybdänsäure einen weissen Niederschlag, mit Phosphorwolframsäure nichts, Jodquecksilberkalium dichten gelben Niederschlag, Jodlösung braunen Niederschlag, Tannin gelblich braunen Niederschlag, Pikrinsäure dichten gelben Niederschlag, Platinchlorid nichts, Goldchlorid dichten gelben Niederschlag.

Scharlach, 18 Liter Harn. Ptomain halbkrySTALLINISCH, weiss, in Wasser löslich, schwach alkalisch; die Lösung in sehr verdünnter Salzsäure gab folgende Niederschläge: Phosphormolybdänsäure blass gelblichweiss, Phosphorwolframsäure weiss, Jodquecksilberkalium blass gelblichweiss, Jod braun, Pikrinsäure gelb, Goldchlorid geringer gelber Niederschlag. Tannin und Platinchlorid fällten nicht.

7. A. B. Griffiths macht über eine ganze Reihe bei verschiedenen Krankheiten im Harn auftretender Alkaloide Angaben. Im normalen Harn kommen sie nicht vor.

Ich kürze ab: Niederschlag = N., Reagens = R., Tannin = T., Pikrinsäure = P., Phosphorwolframsäure = Pwfs., Phosphormolybdänsäure = Pbds. Der Beschreibung der Substanz füge ich sogleich das Zitat hinzu, Comptes rendus = C. r.

a) Parotitis.  $C_6H_{13}N_3O_2$  (isomer mit Lysatin), weisse Prismen, löslich in Wasser, Äther, Chloroform, neutral, bitter. Das Chlorhydrat und das Chloroplatinat krystallisieren. N. mit Pbds. goldgelb, mit Pwfs. weiss,  $K_2HgJ_4$  hellgelb, T. braun. Beim Kochen mit Quecksilberoxyd entstehen nacheinander Kreatin, Methylguanidin und Oxalsäure, wonach die Basis Propylglykocyanin (Propylkreatin) wäre. Sehr giftig, bewirkt bei der Katze Erregung, Stillstand der Speichelsekretion, Krämpfe, Coma und Tod. (C. r. 113. S. 656; Chem. News. 61. S. 87; Chem. Zentralbl. 1890. I. 689.)

b) Scharlach.  $C_5H_7NO_4$  (?), weiss, krystallinisch; löslich in Wasser mit schwach alkalischer Reaktion. Chlorhydrat und Chloraurat krystallinisch. Mit Pbds.

<sup>1)</sup> A. T. Luff, A new method of extracting ptomaines. — Thesis for the degree of M. D. of the University of London 1888; Brit. med. Journ. 1889. II. 193.



gelblichweisser N., mit Pwfs. weisser N., mit P. gelber N. Wird auch durch Nessler'sches R. gefällt. Entsteht auch mit reinen Kulturen von *Microc. scarlatinae* (?) auf Peptongelatine. (C. r. 113. 656. 1891.)

c) Diphtherie.  $C_{14}H_{17}N_2O_6$  (?), weiss, krystallinisch. Bildet Chlorhydrat und Chloraurat. N. mit T. gelb, mit Pbds. weiss, P. gelb, Nessler'sches R. braun. Entsteht auch in Kulturen des *Bac. diphth.* Nr. 2 von Klebs und Loeffler. (Dasselbst.)

d) Masern.  $C_2H_5N_3O$  (Glykocyamidin), weisse Täfelchen, mit alkalischer Reaktion löslich in Wasser. Chloroplatinat  $(C_2H_5N_3O)_2H_2PtCl_6$ , mikroskopische Nadeln. Die Verbindung mit Sublimat bildet fast unlösliche prismatische Nadeln. Gibt N. mit P., Pbds. und Pwfs. Sehr giftig, ruft bei der Katze Fieber (40 %) und in 36 Stunden den Tod hervor. (C. r. 114. 497. 1892.)

e) Keuchhusten.  $C_{15}H_{19}NO_2$ , weiss, krystallinisch, löslich in Wasser, bildet ein Chlorhydrat und ein Chloraurat. N. mit Pbds. weiss, P. gelb, T. braun. Entsteht auch in Kulturen des Keuchhusten-Bacillus von Afanasieff. (Dasselbst.)

f) Rotz.  $C_{15}H_{19}N_2O_6$ , weiss, krystallinisch, löslich in Wasser, alkalisch. Das Chlorhydrat, Chloraurat und Chloroplatinat krystallisieren. Grünlicher N. mit Pwfs., bräunlich weisser mit Pbds., gelber mit P., wird auch durch Nessler'sches R. gefällt. Entsteht auch in Kulturen des *Bac. mallei*. Bewirkt subkutan beim Kaninchen einen Abszess an der Injektionsstelle, spezifische Knoten in Lunge und Milz, metastatische Abszesse und den Tod. (C. r. 114. 1382. 1892.)

g) Pneumonie.  $C_{20}H_{26}N_2O_3$ , weisse Nadeln, in Wasser löslich, alkalisch, bildet ein Chlorhydrat, Chloraurat, Chloroplatinat. Weisser N. mit Pwfs., gelblich weisser mit Pbds., bräunlicher mit Nessler'schem R., gelber etwas löslicher mit P. Dreht rechts,  $[\alpha]_D = 23,5^\circ$ . (Dasselbst.)

h) Epilepsie.  $C_{10}H_{15}N_5O_7$ , weisse schiefe Prismen, löslich in Wasser, alkalisch. Das Chlorhydrat und das Chloraurat krystallisieren. N. mit  $HgCl_2$  grünlich weiss,  $AgNO_3$  gelblich, Pwfs. weiss, Pbds. bräunlich weiss, T. gelb. Verursacht Zittern, Stuhl- und Hamdrang, Erweiterung der Pupillen, Krämpfe, Tod. (C. r. 115. 185. 1892.)

i) Erysipel.  $C_{11}H_{13}NO_3$ , orthorhombische Platten, löslich in Wasser, schwach alkalisch.  $HgCl_2$  gibt weissen N.,  $ZnCl_2$  körnigen, in der Wärme unter Zersetzung löslichen N., Nessler'sches R. grünen N., P. gelben etwas löslichen N., Goldchlorid gelben, in Wasser löslichen N. Das Chloroplatinat  $(C_{11}H_{13}NO_3)_2H_2PtCl_6$  bildet prismatische Nadeln. Wird auch gefällt durch Pwfs., Pbds., T. Sehr giftig, erregt Fieber und tötet in 18 Stunden. (C. r. 115. 667. 1892; Bull. de la Soc. chim. [3] 7. 250.)

k) Kindbettfieber.  $C_{22}H_{19}NO_2$ , weiss, krystallinisch, löslich in Wasser, alkalisch. Das Chlorhydrat und das Chloraurat krystallisieren. Mit T. roten N., P. gelb, Pbds. bräunlich weiss, wird durch Nessler'sches P. gefällt. Sehr giftig, tötet einen Hund in 12 Stunden. (C. r. 115. 668.)

l) Ekzem.  $C_7H_{15}NO$ , weiss, krystallinisch, löslich in Wasser, alkalisch; Chlorhydrat, Chloraurat, Chloroplatinat krystallisieren. Pwfs. bräunlicher N., Pbds. gelblich, P. gelb,  $AgNO_3$  gelblich,  $HgCl_2$  grünlich; auch Nessler'sches R. fällt. Lösung in sterilisiertem Wasser verursacht subkutan beim Kaninchen Entzündung an den Einstichstellen, starkes Fieber, Tod. (C. r. 116. 1205. 1893.)

m) Influenza.  $C_9H_9NO_4$ , weisse prismatische Nadeln, schwach alkalisch; Chlorhydrat, Chloroplatinat und Chloraurat krystallisieren. Pwfs. bräunlicher N., Pbds. gelblich, P. gelb, T. rot,  $HgCl_2$  weiss, Nessler'sches R. braun,  $ZnCl_2$  fällt nicht. Verursacht starkes Fieber, Tod in 8 Stunden. Verschieden von dem Pneumonie-Ptomain. (Griffiths und R. S. Ladell, C. r. 117. 744. 1893.)

n) Carcinoma uteri.  $C_8H_5NO_5$ , weisse mikroskopische Nadeln, löslich in Wasser, alkalisch. Gibt ein Chlorhydrat, Chloroplatinat, Chloraurat. Pwfs. gelben N., Pbds. bräunlich,  $AgNO_3$  rot,  $HgCl_2$  grau, Nessler'sches R. bräunlich. Verursacht Fieber und in 3 Stunden den Tod. (C. r. 118. 1350. 1894.)



o) Pleuritis.  $C_5H_7N_3O_2$  (?), aus Chloroform farblose, zweiaxige, rechtwinklige Tafeln, scheidet sich aus heissem Wasser in federförmigen Aggregaten von schwachem hagedornartigen Geruch aus, wird durch Salzsäure bei langem Stehen als weisses krystallinisches Chlorhydrat gefällt, gibt mit Nessler'schem R. hellgelben N., der bei längerem Stehen bräunlich wird, während sich die Lösung fleischrot färbt; in der Wärme löst sich der N. farblos. Ferrocyankalium in der Kälte keinen N., nach dem Erwärmen weisser oder hellgelber N., der bei längerem Stehen grünlich wird. Eisenchlorid weisser N.,  $K_2CdJ_4$  roter N.,  $K_3BiJ_6$  grüner, Phosphorantimonsäure bläulicher, Pwfs. krystallinischer weisser N. Giftig. (Chem. News 70. 109; Chem. Centralbl. 1894. 2. 1000.)

p) Angina pectoris.  $C_{10}H_9NO_4$ , weiss, krystallinisch, löslich in Wasser, schwach alkalisch. Chlorhydrat, Chlorplatinat, Chloraurat krystallinisch. Pwfs. gelblicher N., Pbds. gelb, T. rot,  $AgNO_3$  grünlich,  $HgCl_2$  grünlich, Nessler's R. braun. Fieber und Tod in 2 Stunden. (Griffiths und C. Massey, C. r. 120. 1128. 1895.)

8. Chiaruttini<sup>1)</sup> hat in 12 Fällen von Epilepsie, Hysterie, Chorea und ähnlichen Nervenkrankheiten den Harn nach Zusatz von Weinsäure eingedampft, darauf mit Ammoniak oder Natriumcarbonat alkalisch gemacht und mit Äther extrahiert. Er gibt an, in allen Fällen Alkaloide gefunden zu haben, welche bei Tieren oft ähnliche Zustände hervorriefen, wie bei den Kranken, von denen der Harn stammte. Grössere Dosen töteten unter Krämpfen.

9. Boinet und Silberet<sup>2)</sup> haben bei Morbus Basedowii drei Ptomaine gewonnen, welche bei Tieren ähnliche Erscheinungen verursachten, wie sie bei den Kranken selbst bisweilen gefunden werden.

10. Nencki hat die Angaben von Griffiths über das Vorkommen von Ptomainen in pathologischen Harnen für Typhus und Rotz nicht bestätigen können. Auch hat Kressling auf Veranlassung von Nencki 10 Liter Bouillonkultur von Rotz nach der Vorschrift von Griffiths verarbeitet, ohne dass es ihm gelang, eine wägbare Menge Ptomain aufzufinden. Ebenso wenig konnte Nicola<sup>3)</sup> das Vorkommen von Glykocyamidin oder einer anderen charakteristischen Base im Harn von Masernkranken bestätigen.

11. Die Untersuchungen von Albu<sup>4)</sup> bringen dagegen wieder eine teilweise Bestätigung der Angaben von Griffiths.

Albu hat den Harn untersucht teils nach dem ursprünglichen Verfahren von Stas und Otto, teils nach dem kürzeren von Griffiths. Er fand Alkaloide bei Scharlach, Masern, Pneumonie, Diphtherie, Phthisis mit hektischem Fieber, Sepsis bei Uteruskarzinom, Erysipel, Morbus Basedowii, Tetanie, perniziöser Anämie, Autointoxikation mit Urticaria nach akutem Magenkatarrh, Coma diabeticum, wenn auch nicht in allen Fällen, wo mehrere zur Untersuchung kamen. Keine oder wenigstens keine krystallinische Substanz wurde gefunden bei Gesunden, Typhus abdominalis, puerperaler Sepsis, akutem Gelenkrheumatismus, Urämie, Cholera, Eklampsie, Magenkarzinom, Crises gastriques bei Tabes, Morbus Addisonii, Erythema nodosum. Auch aus dem Harn eines Hundes, der wochen-

<sup>1)</sup> E. Chiaruttini, La Riforma med. 133—135. 1893; Jahresber. f. Tierchem. 23. S. 548.

<sup>2)</sup> Boinet und Silberet, Revue de méd. 1892; Jahresber. f. Tierchem. 22. S. 495.

<sup>3)</sup> M. Nencki, Jahresber. f. Tierchem. 1893. S. 601. — F. Nicola, Giornale Farm. Chim. 51. 241. 1902, zit. nach Jahresb. f. Tierch., 32. 792.

<sup>4)</sup> A. Albu, Berliner klin. Wochenschr. 31. 8. u. 1081. 1894.

lang auf Fleischkost gesetzt worden war, konnte kein Alkaloid gewonnen werden. Es bleibt dahingestellt, ob der Misserfolg etwa dadurch zustande kam, dass zu wenig Harn verarbeitet wurde.

In den positiven Fällen war das erhaltene Produkt meist sogleich rein oder durch Umkrystallisieren leicht rein zu erhalten. Die Ausbeute war immer gering und reichte niemals für eine Elementaranalyse aus. Die physikalischen und chemischen Eigenschaften waren im allgemeinen die von Griffiths angegebenen, aber bei Scharlach und Masern stimmten sie nicht immer mit dem Befund von Griffiths, und die einzelnen von Albu bei derselben Krankheit (Masern, Scharlach und Pneumonie) dargestellten Substanzen waren untereinander verschieden.

In mehreren Fällen konnten die Alkaloide in der Form von Chloroplatinaten und Chlorauren gewonnen werden; meist brachten aber Goldchlorid, Platinchlorid, sowie auch Pikrinsäure nur wolkige Trübungen hervor, keine krystallinischen Niederschläge. Am konstantesten traten Niederschläge mit Phosphorwolframsäure und Phosphormolybdänsäure auf, nächst diesen am häufigsten der mit Jodquecksilberkalium. Oft gelang auch die Probe mit Eisenchlorid und Ferricyankalium (Bildung von Berlinerblau).

Albu teilt folgende Einzelbefunde mit.

a) Scharlach. Aus 4,25 Liter Harn (von zwei Fällen) 15,4 mg Substanz, nach dem Umkrystallisieren aus Alkohol Büschel langer spitzer Nadeln, alkalisch, leicht löslich in Wasser, schwer in Äther. Schmelzpunkt 133°. Phosphorwolframsäure gab einen reichlichen, flockigen, Phosphormolybdänsäure einen spärlichen Niederschlag, beide in der Wärme löslich, beim Erkalten wieder auftretend. Tannin,  $K_2HgJ_4$  und  $K_2BiJ_6$  gaben reichliche Niederschläge, Pikrinsäure Trübung, Goldchlorid nur einen sehr feinen, wolkigen Niederschlag. 6 mg töteten eine weisse Maus in 3 Stunden unter heftiger Atemnot und Krämpfen,

b) Schwere Diphtherie. Aus 3,5 Liter Harn (drei Fälle) 29 mg Substanz. Weisse, rechtwinkelige Tafeln, stark alkalisch, geruchlos, luftbeständig, leicht löslich in Wasser, wenig in Äther. Schmelzpunkt 121—122°. Phosphorwolframsäure gab einen weissen, im Überschuss löslichen Niederschlag, Phosphormolybdänsäure einen gelben, Tannin einen dicken, graubraunen, „Wismuth-Quecksilberjodid“ einen dichten, rubinroten Niederschlag. Die übrigen Alkaloidreagentien riefen weder Niederschlag noch Trübung hervor. 10 mg, in Wasser subkutan, töteten eine weisse Maus augenblicklich.

c) Pneumonie. Aus 8 Liter Harn (1 Fall) 36 mg, weisse viereckige Tafeln, stark alkalisch, leicht löslich in Wasser, Äther, Alkohol, luft- und lichtbeständig, geruchlos. Die Substanz sintert bei 126°. Phosphorwolframsäure weissgrauer amorpher Niederschlag, Phosphormolybdänsäure dicker, gelber, wolkiger Niederschlag, Tannin leichter, wolkiger, grauer Niederschlag, „Wismutquecksilberjodid“ dicker, amorpher, rotbrauner Niederschlag, Platinchlorid reicher, wolkiger Niederschlag. 10 mg töten eine weisse Maus, 20 mg machen bei einem Kaninchen keine Erscheinungen.

d) Schweres Gesichtserysipel. 6,5 Liter Harn, 24,7 mg rötlich weisse, krystallinische, durch eine geringe Beimengung verunreinigte Substanz, alkalisch. Phosphormolybdänsäure, Tannin, „Wismutquecksilberjodid“ geben amorphe, flockige Niederschläge, Platinchlorid Trübung, Goldchlorid nichts. Tierversuch negativ.

In einigen Fällen fand zur Aufsuchung von Alkaloiden im Harn das Verfahren von Brieger, und zwar mit Erfolg, Anwendung.

12. Marino Zucco und Dutto<sup>1)</sup> suchten nach folgender Methode im Harn eines an Morbus Addisonii Leidenden Neurin nachzuweisen,

<sup>1)</sup> F. Marino Zucco und U. Dutto, Moleschotts Untersuchungen zur Naturlehre. 14. 617. 1894.

dem sie auf Grund theoretischer Erwägung eine besondere Rolle in der Pathologie dieser Krankheit zuschrieben:

Der Harn von 12 Tagen wurde auf 1 Liter eingedampft und mit überschüssigem Barythydrat gekocht, bis der Ammoniakgeruch verschwunden und fast aller Harnstoff zersetzt war. Die alkalische Flüssigkeit wurde filtriert, mit Kohlensäure gesättigt und dann mit Bleiessig ausgefällt. Im Filtrat vom Bleiniederschlag wurde das Blei durch Schwefelwasserstoff ausgefällt; das Filtrat vom Schwefelblei wurde auf dem Wasserbad unter tropfenweisem Zusatz von Schwefelsäure eingedampft. Nach Verjagen der Essigsäure wurde der Sirup mit Wasser verdünnt, erst aus saurer, dann aus alkalischer Lösung mit Chloroform ausgeschüttelt. Das Chloroformextrakt aus alkalischer Lösung wurde mit Schwefelsäure schwach angesäuert, mit Tierkohle aufgekocht, filtriert und mit Jodwismuth-Kalium gefällt. Der flockige, orangegelbe Niederschlag wurde mit Schwefelwasserstoff zersetzt. Die Jodhydrate wurden mit Silberoxyd zerlegt und filtriert. Die schwach alkalische Flüssigkeit wurde mit Salzsäure angesäuert, von etwas Chlorsilber abfiltriert und erst auf dem Wasserbad, dann im Vacuum eingetrocknet. Der Rückstand wurde mit einem Teil absoluten Alkohols und zwei Teilen Äther behandelt. Vom Ungelösten wurde abfiltriert, das Filtrat hinterliess einen sirupösen Rückstand, dessen wässrige Lösung mit Jodwismuth-Kalium einen orangegelben, mit Jodquecksilber-Kalium einen weissen, flockigen Niederschlag, mit Goldchlorid eine krystallinische Fällung gab. Mit Quecksilberchlorid und mit Pikrinsäure trat kein Niederschlag auf. Das Goldsalz, das zunächst flockig ausfiel, wurde wiederholt mit Schwefelwasserstoff zerlegt und wieder gefällt. Schliesslich wurden geringe Mengen eines in kleinen, glänzenden Krystallnadeln krystallisierenden Goldsalzes erhalten, von dem 43,5 mg zur Goldbestimmung verwandt wurden. Der Goldwert stimmte auf die Formel  $C_5H_{14}NO \cdot AuCl_3$ , also auf das Goldsalz des Cholins, nicht des Neurins, worauf schon Kutscher und Lohmann<sup>1)</sup> hinwiesen. Beim Veraschen des Salzes trat Geruch nach Trimethylamin auf. — Ob das Cholin, falls es wirklich vorlag, bei der eingreifenden Behandlung des Harns nicht erst sekundär entstanden ist, lässt sich nicht entscheiden.

13. Albu, sowie Ewald und Jacobson<sup>2)</sup> untersuchten einen und denselben Fall von Tetanie. Albu stellte aus Harn, der während der Anfälle entleert wurde, über 0,5 g einer weissen Substanz dar, welche fast sämtliche Alkaloidreaktionen gab, auch schöne Gold- und Platinsalze, aber, da sie nicht rein war, nur 0,164 g reines Chloroplatinat. Die von Ewald und Jacobson gewonnene Substanz lieferte ein in langen Nadeln krystallisierendes Pikrat, war aber nicht giftig.

14. Ewald und Jacobson haben nach demselben Verfahren weiter untersucht den Harn in drei Fällen von Magenkarzinom (zweimal mit Erfolg), 1 Fall von urämischem Coma und 1 Fall von Morbus Addisonii mit Erfolg. Ein negatives Resultat ergab sich in je 1 Fall von Bauchfelltuberkulose, traumatischer Neurose und multipler Neuritis. Es wurden von den Alkaloiden die Pikrate in grossen Nadeln erhalten, in 2 Fällen auch Platinsalze (kein Salmiak!). Die Ausbeute war gering. Der Morbus Addisonii ergab über 1 g Pikrat. Bei der Analyse desselben wurde gefunden: 32,59 % C, 2,78 H, 13,28 N, 51,35 O, woraus Ewald und Jacobson für die Basis die Formel  $C_5H_7NO_6$  ableiten. Für das Pikrat  $C_5H_7NO_6 \cdot C_6H_7(NO_2)_3$  . OH berechnen sich 32,41 % C, 2,46 H, 13,90 N, 51,23 O.

15. Kijanitzin<sup>3)</sup> hat aus dem Harn von Kaninchen und Hunden, denen die Haut in grösserer Ausdehnung verbrannt worden war, nach dem Verfahren von Brieger eine Substanz mit ähnlichen chemischen Eigenschaften und von derselben Giftwirkung wie das Peptotoxin dargestellt.

<sup>1)</sup> Kutscher und Lohmann, Zeitschr. f. physiol. Chem. 48. 6. 1906.

<sup>2)</sup> Albu, a. a. O. 1082. — C. A. Ewald und J. Jacobson, Berliner klin. Wochenschr. 31. 25. 1894.

<sup>3)</sup> F. Kijanitzin, Virchows Arch. 131. 443. 1893.



Die Substanz war amorph, gelblich oder gelbbraun, roch sehr scharf und unangenehm, löste sich leicht in Wasser und in Spiritus, schwer in Benzin und in Chloroform, nicht in Äther. Jodjodkalium und Jodjodwasserstoff gaben sehr reichliche, rotbraune Niederschläge, Phosphorwolframsäure, Phosphormolybdänsäure und Meyers Reagens reichliche, weisse Niederschläge, Millons Reagens einen weissen, an der Luft rot werdenden Niederschlag, Kaliumwismuthjodid einen unbedeutenden, orangefarbenen Niederschlag, Tannin einen kaffeebraunen, Sublimat einen weissen, Platin- und Goldchlorid unbedeutende, gelbliche Niederschläge, Ferricyankalium und Eisenchlorid Berlinerblau.

Reiss <sup>1)</sup> erhielt aus dem Phosphorwolframsäure-Niederschlag des Menschenharns nach schweren Verbrennungen Lösungen, die, in geringer Menge subkutan injiziert, Mäuse in einen soporösen Zustand versetzten und in einigen Minuten töteten. Nach dem Geruch und dem Schmelzpunkt des nicht weiter gereinigten Platinsalzes hielt er die giftige Substanz für Pyridin oder eine Pyridinbase.

H. Pfeiffer <sup>2)</sup> bestätigte die schon von anderen beobachtete hohe Giftigkeit des Harns von Tieren und Menschen nach ausgedehnten Verbrühungen. Als Symptome der Giftwirkung bei Mäusen führt Pfeiffer an: Apathie und Schwäche, Polyurie, Methämoglobinurie, tonisch-klonische Krämpfe bei Berührung, Cheyne-Stokesche Atmung, Tod nach stundenlanger Agone. Bei Meerschweinchen und Kaninchen wirkt das Harngift auch nekrotisierend an der Injektionsstelle und auf die Schleimhäute des Intestinaltrakts.

Das Harngift ist leicht löslich in Wasser, Alkohol und Glycerin, unlöslich in Chloroform, Äther und Petroläther. Es fällt vollständig mit Quecksilberchlorid aus saurer Lösung, verändert sich aber bei Zersetzung des Quecksilber-Niederschlags mit Schwefelwasserstoff. Es ist fällbar durch Phosphorwolframsäure, teilweise aussalzbar durch Ammonsulfat. Gegen Licht und Wärme ist es sehr empfindlich. Die nekrotisierende Komponente ist empfindlicher als die neurotische. Vielleicht handelt es sich nur um vermehrte Ausscheidung normaler Harngifte (Pfeiffer <sup>3)</sup>).

16. Nach dem Briegerschen Verfahren arbeitete auch Dresbach <sup>4)</sup> mit kleinen Modifikationen: 4 Liter normaler Urin wurden mit Bleizucker ausgefällt, das Filtrat zum Sirup eingeeengt und der Sirup mit 96 %igem Alkohol extrahiert. Das filtrierte Extrakt wurde mit einer alkoholischen Lösung von Bleizucker gefällt. Das Filtrat von der Fällung wurde wieder konzentriert und mit 96 %igem Alkohol extrahiert, das alkoholische Extrakt abermals konzentriert, mit Wasser aufgenommen und aus der wässrigen Lösung das Blei mit Schwefelwasserstoff entfernt. Das Filtrat vom Schwefelblei wurde mit Salzsäure angesäuert, zum Sirup eingeeengt und mit Alkohol extrahiert. Die alkoholische Lösung wurde mit gesättigter alkoholischer Sublimatlösung ausgefällt, die Quecksilbersalze in die Chlorhydrate verwandelt, in Alkohol gelöst und die Lösung zur Injektion eingedampft und mit Wasser aufgenommen. Die Lösungen, die fast frei von anorganischer Substanz waren, auch keine Xanthinkörper enthielten, waren verschieden giftig. Meist traten Krämpfe auf nach Injektion unter die Haut bei Mäusen. Die Respiration war unregelmässig und angestrengt. In einem Fall war die Wirkung auf die Atmung der einzige Effekt. Die kleinen Arterien der Extremitäten waren öfters erweitert. Beobachtungen über Puls und Herz wurden nicht angestellt.

17. Über die Erfolge, welche die Behandlung des Harns mit Benzoylchlorid und Natronlauge hat, liegen Angaben von Kerry und Kobler <sup>5)</sup> vor.

<sup>1)</sup> Reiss, Arch. f. Dermatol. u. Syphilis 25. Erg.-Heft 141. 1893.

<sup>2)</sup> H. Pfeiffer, Virchows Archiv 189. 367. 1905.

<sup>3)</sup> H. Pfeiffer, Zeitschr. f. Hygiene u. Infektionskr. 54. 482. 1908.

<sup>4)</sup> M. Dresbach, Journ. of exper. med. 5. 315. 1900; dort Lit.

<sup>5)</sup> R. Kerry und G. Kobler, Wiener klin. Wochenschr. 1891. S. 525.



Sie untersuchten Harn bei Typhus, Diphtherie, Pyämie, Tuberkulose und Pneumonie. Wurde die klare Lösung des gewaschenen Niederschlags in Alkohol mit Wasser stark verdünnt, so entstand in allen Fällen, besonders aber zur Zeit des Fieberabfalls, eine zumeist sehr dichte, gelbe bis rotgelbe Trübung, aus der sich häufig ein krystallinischer Niederschlag absetzte. Harn von Gesunden oder von Kranken, die an einer anderen als einer Infektionskrankheit leiden, oder Harn von Infektionskranken nach der Entfieberung zeigt dagegen nur eine leichte Trübung, gewöhnlich nur eine geringe Opaleszenz. Ein aus der Benzoylverbindung abgespaltenen basischer Körper gab Alkaloidreaktionen; die Benzoylverbindung enthielt Stickstoff, war aber nach dem Schmelzpunkt kein Benzamid. Die Menge des basischen Körpers (aus ungefähr 1 Liter Harn) war sehr gering. Er rief schon in kleinen Mengen Vergiftungserscheinungen hervor, beim Frosch in kurzer Zeit den Tod.

Über die Isolierung der Diamine mit Benzoylchlorid und Natronlauge, sowie über das Auftreten von Tribenzamid bei dieser Reaktion s. S. 691.

18. Gardeur<sup>1)</sup> untersuchte mit seiner unter C. 4. beschriebenen Methode namentlich Harn von Geisteskranken (aufgeregtten Melancholikern).

Er fand bei Patient I eine flüchtige Base von Weissdorngeruch, bei II ein aus Äther und aus Chloroform in feinen mikroskopischen Nadeln krystallisierendes Alkaloid (3 mg aus 2 Liter), bei III und IV ölige Alkaloide (12—15 mg aus 1,8 bzw. 10 Liter), bei V ein flüssiges Alkaloid von cicutinartigem Geruch, bei VI minimale Quantitäten eines krystallinischen Alkaloids, das noch einer besonderen Reinigung durch Meyers Reagens (wässrige Lösung von 13,546 g HgCl<sub>2</sub> und 49,8 g KJ in 1 Liter) bedurfte, bei VII Cadaverin. — Aus Urinen von normalen Personen wurden nur geringe Mengen einer öligen Substanz von Weissdorngeruch isoliert.

19. Das „Urohypertensin“ von Abelous und Bardier<sup>2)</sup>: 1 Liter Urin wird mit festem Sublimat gesättigt; nach einigen Stunden wird filtriert und das Filtrat mit Schwefelwasserstoff von Quecksilber befreit. Das Filtrat vom Schwefelquecksilber wird auf etwa 10 ccm auf dem kochenden Wasserbad eingeengt und die stark gefärbte, saure konzentrierte Flüssigkeit mit 300 ccm absolutem Alkohol versetzt. Man filtriert und verjagt im Filtrat den Alkohol auf dem siedenden Wasserbad, macht den Rückstand zunächst mit gepulvertem Natriumcarbonat, zum Schluss mit Natronlauge alkalisch und zieht erschöpfend mit Äther aus, der etwas Farbstoff mit aufnimmt. Die ätherische Lösung wird abgesehen und vorsichtig mit einer gesättigten, ätherischen Oxalsäurelösung versetzt, bis keine Fällung oder Trübung mehr entsteht. Man filtriert, trocknet den Rückstand (A) bei niedriger Temperatur über Schwefelsäure und lässt im Filtrat spontan den Äther verdunsten (Rückstand B). Die Ausbeute an A beträgt etwa 1 mg aus 1 Liter Harn.

<sup>1)</sup> A. Gardeur, Travaux de laboratoire de l'Inst. Solvay. Brüssel. II. H. 1. 1898; Jahresber. f. Tierchem. 28. 706.

<sup>2)</sup> J. E. Abelous et E. Bardier, Journ. de physiol. et de pathol. gén. 10. 627. 1908 und 11. 34. 1909.

Der Rückstand A hat bei intravenöser Injektion eine stark pressorische Wirkung und wird als Urohypertensin bezeichnet. Er wirkt ausserdem fördernd auf die Sekretion der Speichel- und Nasendrüsen und ruft eine vorübergehende Narkose hervor. Die einheitliche Natur ist nicht sicher gestellt. — Der Rückstand B wirkt ausgesprochen depressorisch. — Die pressorische Wirkung scheint dem normalen, nicht aber jedem menschlichen Urin zuzukommen. Sie fehlte im Urin von arteriosklerotischen Patienten, ebenso im Urin vom Hund, Kaninchen, Schwein, Rind und Pferd. Die Urine dieser Tiere wirken vielmehr depressorisch. Im menschlichen Urin ist die pressorische Wirkung von der Diät abhängig, sie ist am stärksten nach Fleischnahrung, gering im Harn von Kindern (A belous und Bardier<sup>1)</sup>).

Nach Ansicht der Entdecker<sup>2)</sup> ist das Urohypertensin vielleicht mit einer von A belous und Ribaut aus faulem Fleisch isolierten Base von der wahrscheinlichen Zusammensetzung  $C_6H_{11}NO$  verwandt, da beide Substanzen sich chemisch und in ihrer Gefässwirkung ähnlich verhalten.

Das Urohypertensin ist nicht dialysabel, wird nicht von Tierkohle zurückgehalten und ist weder durch Sublimat noch durch Bleiacetat fällbar. Die genauere Analyse der physiologischen Wirkung zeigt, dass die Substanz eine starke Erregung des Respirationencentrums und gleichzeitig eine Hemmung des Vaguscentrums für die Herztätigkeit bewirkt. Die Hauptwirkung aber besteht in einer Reizung der peripheren Ganglien und der glatten Muskelfasern aller Gefässe. Wirksam ist die aus 100 bis 10 ccm Urin erhaltliche Menge Substanz; wiederholte und grosse Dosen führten nicht den Tod herbei. — Durch Oxydation mit Natriumchlorat und schon durch mehrstündiges Erwärmen im Brutschrank wird das Urohypertensin giftiger. Die Giftwirkung wird durch eine vorhergehende Injektion von Natriumthiosulfat aufgehoben (A belous u. Bardier<sup>3)</sup>).

C. Darstellung und Nachweis. Ausser den unter B. angeführten einzelnen Darstellungsmethoden für physiologisch wirksame Substanzen sind folgende allgemein für normale und pathologische Urine verwendbare Methoden anzuführen.

1. Verfahren von Luff und von Griffiths<sup>4)</sup>. Dasselbe ist das Verfahren von Stas und Otto zur Ausmittelung der Alkaloide in vereinfachter Form. Luff hat es angegeben und Griffiths befolgt.

<sup>1)</sup> A belous et Bardier, Compt. rend. Soc. Biol. **65**. 63 u. 560. 1908.

<sup>2)</sup> A belous et Bardier, Compt. rend. Soc. Biol. **64**. 906. 1908.

<sup>3)</sup> J. E. A belous et E. Bardier, Compt. rend Soc. Biol. **71**. 62. u. 174. 1911.

<sup>4)</sup> Luff, a. a. O. — A. B. Griffiths, Comptes rendus **113**. 656. 1891.

Eine grosse Menge Harn wird mit kohlensaurem Natron alkalisch gemacht und mit dem halben Volumen Äther ausgeschüttelt; nachdem sich der Harn abgesetzt hat, wird der Äther filtriert und das Filtrat mit einer Lösung von Weinsäure geschüttelt, welche das Alkaloid aufnimmt. Nach dem Verdampfen des Äthers aus der wässerigen Lösung wird diese mit Natriumcarbonat übersättigt, wieder mit dem halben Volumen Äther geschüttelt, der von der übrigen Flüssigkeit getrennte Äther der freiwilligen Verdunstung überlassen und der Rückstand über Schwefelsäure getrocknet. Man erhält nach Albu die Basen entweder sogleich oder durch Umkrystallisieren aus Alkohol rein.

Aussicht auf Erfolg hat man nach Albu nur dann, wenn der erste Harn nach dem Einsetzen der Krankheit verwendet wird. Nach Albu sind mindestens 8—10 Liter Harn in Arbeit zu nehmen, um einigermaßen ansehnliche Mengen Substanz zu erhalten. In einigen Fällen hat Albu den Harn vor der Behandlung mit Äther auf etwa  $\frac{1}{8}$  eingedampft und dasselbe Resultat erhalten wie mit dem nativen Harn. Mehrfache Extraktion des Harns mit Äther ist überflüssig. Chiarutti hat den Harn nach dem Vorgang von Spica nach Zusatz von Weinsäure eingedampft, dann mit Ammoniak oder Natriumcarbonat alkalisch gemacht und mit Äther behandelt.

Bei der Darstellung der schwer löslichen Substanz bei Pleuritis (B. 7. o.) hat Griffiths den Verdunstungsrückstand des zweiten ätherischen Auszugs auf dem Wasserbad mit Ätzkalk eingedampft und den Rückstand mit Chloroform ausgezogen. Der zur Extraktion verwendete Äther muss absolut rein sein, er darf bei spontaner Verdunstung einer grösseren Menge (0,5 Liter) keinen Rückstand hinterlassen, welcher Alkaloidreaktionen gibt. Vaughan und Novy<sup>1)</sup> fanden so in Äther Pyridin.

2. Verfahren nach Brieger<sup>2)</sup>. Der Harn (10—20 Liter) wird nach Zusatz von Salzsäure zum Sirup eingedampft, der Rückstand mit Alkohol ausgezogen und die Lösung mit alkoholischer Quecksilberchloridlösung gefällt. Der Niederschlag wird mit viel Wasser ausgekocht, wobei Eiweiss und Pepton ungelöst bleiben, die Quecksilberverbindungen der Ptomaine aber in Lösung gehen. Sind schwer lösliche solche Verbindungen zugegen, so können sie beim Erkalten auskrystallisieren. Durch Behandeln der Flüssigkeit mit Schwefelwasserstoff und Eindampfen des Filtrats erhält man die Basen als Chlorhydrate.

3. Als Benzoylverbindungen erhält man die Ptomaine nach dem Verfahren, welches von Udránszky und Baumann zur Darstellung der Diamine verwendeten (s. S. 691).

Die isolierten Ptomaine sind dann durch die Alkaloidreaktionen, die Beschaffenheit der Base selbst und ihrer Salze, ihr physiologisches Verhalten und womöglich durch die Analyse näher zu charakterisieren.

<sup>1)</sup> V. C. Vaughan und F. G. Novy, Ptomaines, Leucomaines etc. 3. ed. Philadelphia and New York 1896. S. 264.

<sup>2)</sup> L. Brieger, Weitere Untersuchungen über Ptomaine. Berlin 1885. S. 52. — Ewald und Jacobson, a. a. O.



4. Gardeur (s. B. b) 18.) verwandte zur Prüfung auf physiologische Gifte im Harn folgendes Darstellungsverfahren: Der Urin wird mit Weinsäure angesäuert und im Vacuum bei 45—50° bis zur Sirupkonsistenz eingeeengt, der Rückstand mit konzentrierter Sodalösung versetzt und mit starkem Alkohol extrahiert, wobei das Residuum A ungelöst bleibt. Die filtrierte alkoholische Lösung wird mit 2 Volumen Äther vermischt und das Gemisch vom entstandenen Niederschlag dekantiert; man wäscht mit Äther nach, vereinigt den zum Waschen benutzten Äther mit der ätherisch-alkoholischen Lösung und dampft nach Zusatz einiger Tropfen Essigsäure bei mässiger Wärme ein. Der erhaltene Rückstand B wird mit kleinen Mengen gesättigter Sodalösung versetzt und sukzessive mit Äther, Chloroform und Benzol erschöpft. Die erhaltenen Extrakte werden nach Zusatz eines Tropfen mit Salzsäure gesättigten Alkohols der Verdunstung überlassen. — Ist ein in Äther unlösliches Alkaloid zugegen, so löst man die Extraktivstoffe in Wasser, vereinigt die Lösung mit der von A, säuert mit Salzsäure an, fällt mit Phosphormolybdänsäure im Überschuss und macht nach bekannten Methoden aus dem Niederschlag die Basen frei.

5. Nach Guillemand und Vranceano<sup>1)</sup> werden die Alkaloide wie folgt isoliert: Man konzentriert 3 Liter Urin, in dem man den Gesamtstickstoff bestimmt hat, im Vacuum so weit, dass 1 Liter 20 g Stickstoff enthält. Man fügt 5 % Salzsäure zu, filtriert und fällt das Filtrat vollständig mit 5 % iger Kieselwolframsäure-Lösung aus. Man saugt den Niederschlag ab, wäscht ihn mit destilliertem Wasser aus zur Entfernung überschüssiger Salzsäure und löst ihn kalt in möglichst wenig schwach ammoniakalischem Wasser. Die stark gefärbte Lösung, die kieselwolframsaures Ammoniak und die freien Basen enthält, wird im Vacuum zur Trockne verdampft, und nach Zusatz einiger Tropfen Ammoniak mit absolutem Alkohol im Überschuss versetzt. Dabei bleibt das kieselwolframsaure Ammoniak zurück, der grösste Teil der Basen geht in Lösung. Der Rückstand wird mit Alkohol von 96% erschöpft und die vereinigten alkoholischen Flüssigkeiten werden im Vacuum zur Trockne verdampft. — Nimmt man diesen Rückstand mit physiologischer Kochsalzlösung auf und verdünnt, bis  $\Delta = -0,56^0$  ist, so kann man durch intravenöse Injektion die Giftigkeit der Harnalkaloide messen und mit der Gesamtoxicität vergleichen (s. S. 726).

Nach der beschriebenen Methode fällt das Kreatinin fast quantitativ mit aus. Will man die Alkaloide frei von Kreatinin gewinnen, so fällt man den nicht konzentrierten Harn mit Kieselwolframsäure und extrahiert die Fällung mit wenig Alkohol ohne Ammoniakzusatz. Für die toxische Wirkung kommt das Kreatinin nicht in Betracht.

<sup>1)</sup> H. Guillemand et P. Vranceano, *Compt. rend. Soc. Biol.* 57. 933. 1905.



## Schwefelhaltige Verbindungen der aliphatischen Reihe.

Von A. Ellinger-Königsberg i. Pr.

### I. Rhodanwasserstoff.

#### CNSH.

A. Vorkommen. Rhodansalze sind nach Gscheidlen ein Bestandteil des normalen Harns des Menschen und der Tiere (Hund, Katze, Pferd, Rind, Kaninchen); Külz, I. Munk, sowie Bruylants<sup>1)</sup> haben die Angaben Gscheidlens bestätigt. Im Liter Menschenharn sind nach Gscheidlen etwa 0,035 g, nach Munk 0,11 g, nach Bruylants nur 0,003 g Sulfocyankalium enthalten, im günstigsten Fall macht der Schwefel des Sulfocyanwasserstoffs ungefähr nur  $\frac{1}{3}$  des „neutralen Schwefels“ aus.

Bruylants fand im Liter Menschenharn Spuren bis 8,2 mg Sulfocyankalium, im Pferdeharn 4,4—7,1, im Rinderharn im Mittel 5,4 mg (2,5—10,5). Alle quantitativen Bestimmungen dürften infolge des umständlichen Verfahrens zu niedere Werte ergeben haben. Das Rhodan kommt nach Bruylants nur im Harn von Tieren vor, welche den Stickstoff in Form von Harnstoff ausscheiden, es fehlt bei Vögeln und Reptilien; in 1 kg Schlangensexkrementen traf Bruylants keine Spur davon an. Die Ausscheidung ist unabhängig von der Art der Ernährung. Der Gehalt des Harns an Rhodan ist je nach der Person verschieden, aber die einzelnen Personen weisen trotz verschiedener Ernährung sehr konstante Werte auf. Bei Individuen mit Harnries sinkt der Gehalt des Harns an Rhodan auf  $\frac{1}{20}$  der normalen Menge, und der Harn von Gichtkranken weist während des Anfalls keine Spur auf. — Nach der Inhalation von Schwefelkohlenstoff, welcher bekanntlich in alkoholischer Lösung mit Ammoniak Rhodanammon gibt, stieg der Gehalt des Harns an Rhodankalium auf etwa das Doppelte.

Nach Mayer, der mit der titrimetrischen Rhodanbestimmungsmethode von Rupp arbeitete, schwanken die Rhodanmengen im Harn (in CNS-Ionen ausgedrückt) zwischen 23,5 mg und 78 mg bei Männern, 30—39 mg bei Frauen und Kindern, deren Stoffwechsel nicht gestört war. Ghedini fand als tägliche Rhodanmenge im Harn 9,4 mg bei Gesunden. Einen sicheren Einfluss des Rauchens auf die Rhodanausscheidung, der für die Rhodanmenge im Speichel von Krüger<sup>2)</sup> behauptet wird, hat Mayer nicht feststellen können. Bei ihm selbst stieg der Rhodangehalt nach dem Rauchen einiger schwerer Importzigarren von

<sup>1)</sup> Gscheidlen, Tageblatt der 47. Versammlung der Naturforscher und Ärzte in Breslau 1874. S. 98; 52. Jahresber. d. schles. Gesellsch. f. vaterl. Kultur f. 1874. S. 207. 1875; Pflügers Arch. 14. 401. 1877. — E. Külz, Sitzungsber. d. Gesellsch. z. Beförd. d. gesamten Naturw. in Marburg 1875. S. 76. — I. Munk, Deutsche med. Wochenschr. 1876; 46. Virchows Arch. 69. 354. — J. Bruylants, Bull. de l'Acad. de méd. de Belgique (4) 2. 18; Jahresber. f. Tierchem. 1888. S. 134.

<sup>2)</sup> A. Mayer, Deutsch. Arch. f. klin. Med. 79. 209. 1904. — Ghedini, Rivista Critica di Clinica Medica 1911. Nr. 48. zit. nach G. Diena, Biochem. Zeitschr. 39. 12. 1912. — F. Krüger, Zeitschr. f. Biol. 37. 6. 1899.

31,5 auf 37,7 mg im Liter Harn, während sonst die Rhodanausscheidung bei dem gleichen Individuum an verschiedenen Tagen nur wenig schwankt. Bei reichlicher Diurese scheint mehr Rhodan ausgeschieden zu werden, ebenso nach intensiverer Körperbewegung, wenn diese nicht reichliche Schweissabsonderung zur Folge hat. Die Rhodanmenge im Harn ist am Morgen am kleinsten und erreicht ihr Maximum nach der Hauptmahlzeit, wohl weil dabei am meisten rhodanhaltiger Speichel verschluckt wird (Gscheidlen, Mayer).

Bei 24 von Mayer untersuchten Kranken schwankten die Tagesmengen zwischen 21 und 156 mg. Ausser der Diurese scheint auch Fieber die Rhodanausscheidung zu steigern. Doch hält Mayer selbst die Werte, die bei Fieberkranken gefunden wurden, nicht für sicher, weil möglicherweise der Albumosengehalt des Harns zu fehlerhaften, zu grossen Werten bei der Rhodanbestimmung im Harn führt. Die Analysen lassen deshalb auch keine sicheren Schlüsse zu, ob die Rhodanausscheidung im Harn und Speichel bei pathologischen Fällen parallel gehen, und ob das Speichelrhodan beim Menschen die einzige Quelle des Harnrhodans ist. Diese naheliegende Annahme ist jedenfalls bisher nicht widerlegt, auch nicht durch die Beobachtungen von Edinger und Clemens<sup>1)</sup>, die in verschiedenen Organen von Leichen bestimmbare Mengen, in den Speicheldrüsen keine nachweisbaren Mengen Rhodan fanden. Schätzt man die Mengen Rhodan, die mit dem Speichel verschluckt werden, so ergeben sich Werte derselben Grössenanordnung, wie die im Harn gefundenen, worauf schon Gscheidlen hingewiesen hat. Ghedini fand vermehrte Rhodanausscheidung bei Leberleiden und Diabetes, verminderte nur bei Polysarkie.

Beim Hunde scheinen die Sekretionsverhältnisse und der Kreislauf des im Organismus gebildeten Rhodans andersartig zu sein. Gscheidlen fand im Hundespeichel Rhodan und sah es bei Ableitung des Speichels nach aussen durch Fisteln aus dem Harn verschwinden. Die meisten anderen Autoren haben im Hundespeichel kein Rhodan gefunden, Edinger und Treupel selbst dann nicht, wenn sie den Tieren Rhodan gegeben hatten. Dagegen ist beim Hunde der Magensaft rhodanhaltig, selbst wenn kein Speichel in den Magen gelangt (Nencki). Nach Verabreichung von Rhodaniden fand de Souza beim Hunde ausser im Harn auch in allen anderen Sekreten, dem Submaxillarspeichel, dem Pankreassaft, der Galle und dem Urin Rhodan, in diesen aber stets prozentisch weniger als im Blut. Diena<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup> A. Edinger und P. Clemens, Zeitschr. f. klin. Med. 59. 218. 1906; dort ausführliches Literaturverzeichnis.

<sup>2)</sup> D. H. de Souza, Journ. of physiol. 35. 332. 1907. — G. Diena, Biochem. Zeitschr. 39. 12. 1912.

konnte es in der Galle nach Fütterung mit Rhodalzidtabletten nicht sicher nachweisen, wohl aber im Duodenalinhalt von Fistelhunden.

Über die Entstehung des Rhodans im Tierkörper ist mit Sicherheit nur festgestellt, dass Blausäure, Cyanide und Nitrile in erheblicher Menge in Rhodanide übergehen (Lang, Heymans und Masoin, Reid Hunt) und dadurch entgiftet werden. Woher die betreffenden Cyanverbindungen stammen, ob aus Purinderivaten oder Eiweisspaltungsprodukten, bedarf noch der Aufklärung. Im Anschluss an die Beobachtung von Plimmer, dass Aminosäuren unter bestimmten Oxydationsbedingungen Blausäure liefern können, hat Willanen<sup>1)</sup> festgestellt, dass im Kaninchenharn die Rhodanreaktion auftritt oder zunimmt, wenn man den Tieren mehrere Gramm Glykokoll, Kreatinin, wahrscheinlich auch Adenin eingibt. Eine vermehrte Rhodanausscheidung bei Rauchern würde sich durch den Blausäuregehalt des Tabakrauchs ebenfalls leicht erklären.

Der Schwefel, der zum Übergang der Cyan- in die Rhodanverbindungen nötig ist, kann in vitro von Eiweisskörpern, die locker gebundenen Schwefel enthalten, geliefert werden (Pascheles). Künstlich lässt sich der Entgiftungsvorgang durch Verabreichung von Natriumthiosulfat befördern (Lang, Heymans und Masoin).

Über die Ausscheidung eingeführten Rhodans finden sich stark widersprechende Angaben in der Literatur. Bruylants fand nach Eingabe von 0,1 g Rhodan ammon im Harn der nächsten 48 Stunden nur 13 % wieder, Lang beim Hunde nur ca. 16 % des eingegebenen Rhodans. Dagegen sah Pollak beim Hund, Kaninchen und Menschen das teils per os, teils subkutan zugeführte Rhodan im Laufe von 4—9 Tagen fast quantitativ im Harn wieder erscheinen. In Mayers Versuchen an Menschen wiederum betrug die Menge des ausgeschiedenen Rhodans niemals auch nur die Hälfte des eingegebenen, während nach Kabdebó<sup>2)</sup> bei Hunden von subkutan eingespritztem Rhodan 87 bis 88 % in 3—4 Tagen wieder entleert wurden. Zum Teil dürften sich diese Widersprüche durch die verschiedene Dauer des Harnaufsammelns erklären; vielleicht könnte auch ein Einfluss des Salzgehaltes der Nahrung wie bei der Ausscheidung der Bromide mit im Spiele sein.

B. Eigenschaften. 1. Die Sulfocycansäure bildet eine farblose, in Wasser, Alkohol und in Äther lösliche Flüssigkeit von scharfem, dem der Essigsäure ähnlichen Geruch. Die konzentrierte Säure zersetzt sich leicht zu Persulfocycansäure und Blausäure,  $3 \text{ CNSH} = \text{C}_2\text{N}_2\text{H}_2\text{S}_3 + \text{CNH}$ , die verdünnte (5 % ige) Säure ist viel beständiger.

<sup>1)</sup> K. Willanen, Biochem. Zeitschr. 1. 129. 1906.

<sup>2)</sup> L. Pollak, Hofmeisters Beitr. 2. 430. 1901. — G. Kabdebó, Magyar Orvosi Archivum 1907, zit. nach Jahresb. f. Tierchem. 37. 401.



2. Beim Erwärmen der wässerigen Lösung verflüchtigt sich ein Teil der Säure unzersetzt, während ein anderer Teil unter Wasseraufnahme zu Kohlensäure, Schwefelkohlenstoff und Ammoniak zerfällt:



3. Die meisten Rhodansalze sind in Wasser und in Alkohol löslich, so die Salze der Alkalien und alkalischen Erden und mehrere Metallsalze. Bemerkenswert sind folgende Salze:

a) Das Eisenoxydsalz entsteht beim Versetzen eines Rhodansalzes mit einem Eisenoxydsalz. Es ist ausgezeichnet durch seine intensiv blutrote Farbe, die sich dadurch von der ähnlichen Färbung anderer Eisenoxydsalze (des essigsauren und ameisen-sauren) unterscheidet, dass sie auf Zusatz von Salzsäure nicht verschwindet; auch geben die Lösungen des Rhodaneisens beim Kochen nicht, wie das essigsaure und ameisen-saure Eisenoxyd, einen Niederschlag von basischem Salz. Die Färbung beruht nach Krüss und Moraht<sup>1)</sup> auf der Bildung eines Doppelsalzes  $\text{Fe}(\text{CNS})_3$ , 9  $\text{KCNS}$ , und die Färbung der Lösung ist dann am stärksten, wenn in der Salzmischung auf 1 At (Ferri-) Eisen wenigstens 12 Mol. Rhodanid enthalten sind. Dieses Doppelsalz wird zersetzt und dementsprechend die Rotfärbung vermindert durch Wasser, Neutralsalz (Salmiak, Kochsalz), Salzsäure. Es ist ferner bekannt, dass gewisse organische Säuren (Weinsäure, Milchsäure u. a.) die Färbung zum Verschwinden bringen, dass sie aber auf Zusatz von viel Salzsäure meist wieder hervorgerufen werden kann. Dieses Verhalten ist für die colorimetrische oder spectrophotometrische Bestimmung des Rhodans von grösster Bedeutung. Das Ferrirhodanid löst sich ausser in Wasser auch leicht in Alkohol und in Äther und kann der wässerigen Lösung durch Schütteln mit Äther fast vollständig entzogen werden.

Nach Tarugi<sup>2)</sup> beruht die Rotfärbung der Rhodannate mit Eisenchlorid auf der Bildung einer Peroxysulfo-cyansäure, die nach der reversiblen Gleichung:



in Form ihres Eisensalzes entsteht. Die freie Säure selbst,  $\text{H}_3\text{C}_3\text{N}_3\text{S}_3\text{O}_3$ , wie ihre sauren Salze sind rot gefärbt. Lösungen von Oxalaten, Tartraten etc. verwandeln die Persäure unter Entfärbung in die entsprechenden neutralen Salze, die durch Mineralsäuren unter Bildung der freien Säure und Rotfärbung wieder zer-setzt werden.

b) Eine verdünnte Rhodanidlösung färbt sich selbst noch bei einer Verdünnung von 1 : 4000 mit einem Kupferoxydsalz smaragdgrün (gelblich grün) (Colasanti)<sup>3)</sup> und setzt allmählich einen weissen Niederschlag ab; eine konzentrierte Rhodanidlösung färbt sich mit wenig Kupferoxydsalz dunkelbraun und gibt mit mehr Kupfersalz einen Niederschlag von der Farbe des Schwefelkupfers.

c) Durch ein Kupferoxydulsalz (eine heisse Lösung von Kupfervitriol und saurem Sulfat) wird das Rhodan quantitativ gefällt. Der Niederschlag ist weiss, nimmt aber durch Beimengung von schwefligsaurem Kupferoxyduloxyd leicht eine rötliche Farbe an.

d) Sulfo-cyansilber. Die Sulfo-cyansalze geben mit salpetersaurem Silber einen weissen, dem Chlorsilber ähnlichen Niederschlag, der sich im Licht nicht so leicht schwärzt, wie das Chlorsilber und sich wie das Chlorsilber nicht in Salpetersäure, aber in Ammoniak löst; in verdünnten kalten Lösungen von Sulfo-cyaniden löst sich der Niederschlag nicht.

<sup>1)</sup> G. Krüss und H. Moraht, Ber. d. chem. Gesellsch. **22**. 2054. 1889.

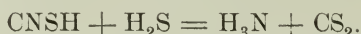
<sup>2)</sup> N. Tarugi, Gaz. chim. ital. **34**. II. 326. 1904, zit. nach Chem. Zentralbl. 1905. I. 260.

<sup>3)</sup> G. Colasanti, Gazz. chim. **18**. 397. 1888; Moleschotts Untersuchungen **14**. 2. Hft.; Jahresber. f. Tierchem. 1889. S. 72; Ber. d. chem. Gesellsch. **22**. Ref. 239.

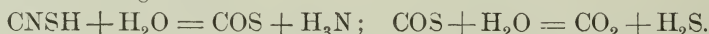


e) Die Bleisalze. Versetzt man die Lösung eines Sulfoeyanmetalls<sup>1</sup> mit einer Lösung von neutralem essigsaurem Blei, so setzen sich allmählich, schneller bei starkem Schütteln, glänzende gelbe Krystalle von Sulfoeyanblei  $(\text{CNS})_2\text{Pb}$  ab. Dieselben sind in kaltem Wasser unlöslich und zersetzen sich beim Kochen mit Wasser. — Auf Zusatz von basisch essigsaurem Blei oder von neutralem essigsaurem Blei und Ammoniak geben die löslichen Sulfoeyanwasserstoffsalze einen weissen käsigen Niederschlag von basischem Salz,  $(\text{CNS})_2\text{Pb}$ ,  $\text{Pb}(\text{OH})_2$ , der beim Trocknen gelblich und pulverig wird, in Wasser völlig unlöslich ist und sich beim Erwärmen mit Salpetersäure heftig unter Bildung von schwefelsaurem Blei zersetzt; in der sauren Flüssigkeit ist nur wenig Blei gelöst enthalten.

4. Mit Schwefelwasserstoff liefert die Säure Ammoniak und Schwefelkohlenstoff



5. Beim Erwärmen mit verdünnter Schwefelsäure in grossem Überschuss zersetzt sich die Säure (oder ein Salz derselben) zu Ammoniak und Kohlenoxysulfid, das seinerseits in Kohlensäure und Schwefelwasserstoff zerlegt wird.



Zweifach saures Phosphat verhält sich wie die Schwefelsäure. Bei Verwendung von organischen Säuren wird zwar das Kohlenoxysulfid entwickelt, das Ammoniak aber (zu Säurenitril oder Säureamid) gebunden.

6. Beim Kochen einer Rhodansalzlösung mit Alkalihydrat oder doppeltkohlensaurem Alkali entsteht kohlensaures Ammon, aber keine Blausäure und kein Sulfid.

7. Permanganat in saurer Lösung, sowie salpetrige Säure oxydieren den Rhodanwasserstoff schon in der Kälte, Salpetersäure in der Wärme unter Entwicklung von Blausäure (Erlenmeyer, Volhard<sup>1</sup>)) nach der Gleichung:



Salpetersäure liefert neben der Blausäure in der Wärme auch Stickstoffoxyd und Kohlensäure.

Es entwickelt sich daher Blausäure, wenn man eine Flüssigkeit, in der man Rhodansalz mit Silbernitrat gefällt hat, mit Salzsäure versetzt.

8. Jodsäure wird von Rhodanwasserstoff zu Jod reduziert, das durch die Blaufärbung nach Stärkezusatz augenfällig gemacht werden kann (Solera, Polacci<sup>2</sup>)).

9. Calomel wird zu metallischem Quecksilber reduziert unter gleichzeitiger Bildung von Mercurirhodanid (Polacci):



<sup>1</sup>) E. Erlenmeyer, Zeitschr. f. Chem. 1859. S. 202. — Volhard, Ann. d. Chem. 190. 60. 1877.

<sup>2</sup>) L. Solera, Rendiconti del R. Institut. Lombardo (II) 10. 371. 1877, zit. nach Jahresber. f. Tierchem., 7. 256. — E. Polacci, Diffusion de l'acide sulfocyanique dans les deux règnes organiques. — Son action sur le calomel. — Etudes originales. Mailand 1904, zit. nach Chem. Zentralb. 1904. I. S. 1070.

Die Reaktion ist ebensowenig wie die sub 8. angegebene für den Rhodanwasserstoff charakteristisch (Archetti<sup>1)</sup>).

10. Neutrale Rhodanidlösungen nehmen bei gewöhnlicher und erhöhter Temperatur keine oder unbedeutende Mengen Jod auf. Dagegen entfärben mit Natriumbicarbonat alkalisch gemachte Lösungen grosse Mengen Jodlösung momentan, erst gegen Ende der Reaktion verlangsamt sich die Aufnahme dermassen, dass Zeitintervalle von etwa 10 Minuten erforderlich sind, um die letzterforderlichen  $\frac{1}{10}$  ccm Jodlösung zu entfärben (Rupp und Schied<sup>2)</sup>).

Die Reaktion verläuft nach der Gleichung:



Anwendung der Reaktion zur quantitativen Bestimmung und Wirkung von Salzsäure auf die Reaktionsprodukte siehe D. c).

11. Mit Zink und Salzsäure liefert der Rhodanwasserstoff u. a. Schwefelwasserstoff.

12. a) Eine konzentrierte Lösung von Rhodankalium färbt sich mit Salpetersäure oder salpetriger Säure blutrot; die Färbung verschwindet beim Erwärmen oder auf Zusatz von Wasser. — b) Wässrige Rhodanwasserstofflösung erzeugt auf Papier, wenn das Wasser verdunstet ist, einen bald verschwindenden roten Fleck. — c) Tränkt man nach Böttger einen Streifen schwedischen Papiers mit Guajakinktur, lässt ihn trocken werden, zieht ihn dann durch eine 2000fach verdünnte Kupfervitriollösung und lässt einen Tropfen einer Rhodansalzlösung auf denselben fallen, so bläut sich diese Stelle. — d) Eine sehr verdünnte Rhodanidlösung gibt mit einigen Tropfen 20 % iger alkoholischer Naphthollösung und ihrem doppelten Volumen konzentrierter Schwefelsäure nach Colasanti<sup>3)</sup> eine starke Violettfärbung.

C. Nachweis und Isolierung. Die folgenden unter a—e angeführten Reaktionen besitzen nur einen zweifelhaften Wert. Sicherer sind die Methoden (f—h), welche von der Isolierung des Rhodanwasserstoffes ausgehen.

a) Man verdünnt nach Külz Eisenchloridlösung, welcher ein paar Tropfen Salzsäure zugesetzt sind, mit Wasser soweit, bis die Flüssigkeit in gleich dicker Schicht die Farbe des Harns besitzt, den man auf Sulfocyanwasserstoff prüfen will, bringt dann einen Tropfen Harn auf einen Porzellanteller und setzt in die Mitte dieses einen Tropfen der Eisenchloridlösung. Bei Gegenwart von Rhodansalz entsteht nach einiger Zeit ein rötlicher Ring, der namentlich beim Eintrocknen

<sup>1)</sup> A. Archetti, Boll. Chim. Farm. 43. 239, zit. nach Chem. Zentralbl. 1904. I. S. 1466.

<sup>2)</sup> E. Rupp und A. Schied, Ber. d. chem. Gesellsch. 35. 2191. 1902.

<sup>3)</sup> Böttger, Zeitschr. f. analyt. Chem. 11. 350. — Colasanti, Moleschotts Untersuchungen 14. 4. Heft; Jahresber. f. Tierchem. 1889. 74. u. 1891. 44.

deutlicher wird. Auch viele andere Harnbestandteile färben sich mit Eisenchlorid rot (vgl. S. 268).

b) Man fällt 100 ccm Harn mit Barytwasser aus, dampft das Filtrat zur Sirupkonsistenz ein, zieht den Rückstand mit Alkohol aus, verdunstet den Alkohol, löst den Rückstand in Wasser, entfärbt die Lösung mit Tierkohle und fügt einige Tropfen verdünnter Eisenchloridlösung zu. Bei Anwesenheit von Sulfoeyanid tritt eine blutrote Färbung ein, welche beim Kochen und bei Zusatz von (eisenfreier) Säure nicht verschwindet (Gscheidlen). (Vergl. S. 268). Ebenso kann man die Prüfung auf Rhodanid nach Colasanti mit Kupfersulfat (B. 3. b) vornehmen.

c) Man bringt in den eiweissfreien Harn einige Stückchen metallisches Zink, fügt Salzsäure hinzu und hält in die Mündung des Gefässes einen mit essigsaurem Blei und Ammoniak benetzten Streifen Filtrierpapier; derselbe schwärzt sich bei Gegenwart von Rhodansalz im Harn. — Die meisten Zinksorten entwickeln mit Salzsäure für sich Schwefelwasserstoff; nur elektrolytisch abgeschiedenes Zink ist sicher schwefelfrei. — Entwickelt der Harn mit schwefelfreiem Zink Schwefelwasserstoff, so ist die Probe nur dann auf Rhodansalz zu beziehen, wenn der Harn weder unterschweflige Säure noch Cystin enthält.

d) Man prüft nach B. 12. c.

e) Harn wird mit Barytwasser ausgefällt, das Filtrat eingedampft und nach dem Ansäuern mit Phosphorsäure der Destillation unterworfen. Im Destillat ist Schwefelwasserstoff und Sulfoeyanwasserstoff nachweisbar (Gscheidlen).

f) Es werden nach Munk 200 ccm Harn mit Salpetersäure angesäuert, darauf mit salpetersaurem Silber ausgefällt; der Niederschlag wird abfiltriert, unter Wasser mit Schwefelwasserstoff zerlegt und die Flüssigkeit der Destillation unterworfen. Das Destillat wird mit einer eisenoxydhaltigen Eisenvitriollösung versetzt, mit Kali- oder Natronlauge alkalisch gemacht, samt dem entstandenen Niederschlag gelinde erwärmt und mit Salzsäure angesäuert. War in dem Silberniederschlag Rhodansilber enthalten, so findet sich in der zuletzt erhaltenen Lösung ein Niederschlag von Berlinerblau vor; sie gibt entweder sogleich blaue Flocken, oder es setzen sich solche aus der grünen Flüssigkeit beim Stehen ab.

g) Man fällt aus Harn die Rhodanwasserstoffsäure nach Gscheidlen als Bleisalz. Der Harn wird zu diesem Zwecke mit Barythydrat alkalisch gemacht, mit salpetersaurem Baryt ausgefällt, das Filtrat verdunstet, der Rückstand mit Alkohol ausgezogen, die Lösung eingedampft, der dabei gewonnene Rückstand in Wasser gelöst, mit neutralem essigsaurem Blei versetzt und sofort filtriert. Das Filtrat wird dann auf dem Wasserbad erwärmt. War im Harn Rhodansalz vorhanden, so setzt die Flüssigkeit bald ein gelbes krystallinisches Pulver des neutralen Salzes ab. Dasselbe wird mit einer Säure (Phosphorsäure) der Destillation unterworfen; im Destillat sucht man die Säure sowie ihre Zersetzungsprodukte.

h) Bruylants versetzt den Harn mit einem geringen Überschuss von Barythydrat, dampft auf die Hälfte ein, filtriert, verdunstet das Filtrat zum Sirup und zieht diesen mit 90%igem Alkohol aus. Zur Ent-

fernung des Harnstoffs wird der Auszug in der Kälte mit gesättigter alkoholischer Oxalsäurelösung ausgefällt, nach einigen Tagen die abgehobene Flüssigkeit zur Entfernung der überschüssigen Oxalsäure mit Kalkhydrat alkalisch gemacht, erwärmt und heiss filtriert. Der nach dem Abdestillieren des Alkohols bleibende Rückstand wird in Wasser gelöst, mit Tierkohle entfärbt, mit überschüssiger Salzsäure versetzt und wiederholt mit Äther ausgeschüttet, welcher den Rhodanwasserstoff aufnimmt. Schüttelt man den Äther darauf mit verdünnter Eisenchloridlösung, so nimmt er infolge der Bildung von Ferrirhodanid eine rote Färbung an.

#### D. Bestimmung des Rhodans.

##### a) Als Silberverbindung.

1. Lang<sup>1)</sup> titrierte zuerst den Harn nach Volhard (s. S. 76) und ermittelte so die Menge des vorhandenen Chlors und Rhodans; dann wurde ein anderer Anteil Harn mit Salpeter verascht und in der Schmelze das Chlor allein bestimmt. Die Differenz ergab die Menge des Rhodans. Dem Harn zugesetztes Rhodanid liess sich scharf wiederfinden.

Oder es wurde dem stark angesäuerten Harn der Rhodanwasserstoff durch Extraktion mit Äther im Extraktionsapparat entzogen, an Alkali gebunden und die Lösung nach Volhard titriert wie bei der Silberbestimmung.

2. Munk<sup>2)</sup> fällte 100 ccm Harn unter Zusatz von Salpetersäure und Silbernitrat vollständig aus, wusch den Niederschlag und bestimmte in ihm durch Schmelzen mit Soda und Salpeter den Schwefel. Aus der Menge desselben wird die Menge des Rhodanwasserstoffs berechnet.

Sowohl die erste Methode von Lang wie die von Munk können falsche Werte geben, falls in den Silberniederschlag noch andere Verbindungen mitgerissen werden, die Munk'sche Methode nur dann, wenn die mitgerissenen Substanzen schwefelhaltig sind. Für den Harn von Hunden und Katzen sind deshalb beide Methoden nicht anwendbar, falls Thiosulfate vorhanden sind.

##### b) Kolorimetrisch.

1. Gscheidlen<sup>3)</sup> dampfte 50 ccm Harn auf ein Drittel ein, versetzte den Rückstand mit Kalkmilch, säuerte das Filtrat an und fügte ihm einige Tropfen Eisenchlorid hinzu. Diese Lösung wurde in planparallelen Glaskästchen von gleichem Durchmesser mit einer Rhodankaliumlösung verglichen, welche im ccm 0,0167 g getrocknetes Salz enthielt und mit Eisenchlorid bis zu vollständiger Rotfärbung versetzt war. Diejenige der beiden Lösungen, welche stärker gefärbt war, wurde mit zugemessenen Mengen Wasser bis zur Farbgleichheit verdünnt und aus der Konzentration die Menge des Rhodankaliums berechnet. Dieses Verfahren kann keinen grossen Anspruch auf Genauigkeit machen (vgl. S. 188. IV.).

<sup>1)</sup> S. Lang, Archiv f. exper. Pathol. **34**. 253. f. 1894.

<sup>2)</sup> I. Munk, Virchows Arch. **69**. 358 u. 351. 1877.

<sup>3)</sup> R. Gscheidlen, Pflügers Arch. **14**. 408. 1877.



2. Bruylants<sup>1)</sup> engte 200 ccm Harn mit einem leichten Überschuss von Soda auf 40 ccm ein, schüttelte den Rückstand nach Zusatz von 10 ccm konzentrierter Salzsäure dreimal mit 20—25 ccm Äther, entfärbte mit Tierkohle und schüttelte den Äther dreimal mit einer 1 %igen Eisenchloridlösung. Die so erhaltenen roten Flüssigkeiten wurden vereinigt zur colorimetrischen Bestimmung verwendet. Auch dieses Verfahren kann keine genauen Resultate geben.

3. De Souza<sup>2)</sup> verfährt im Anschluss an Munks Versuche folgendermassen:

Ein gemessenes Quantum Urin wird in salpetersaurer Lösung mit Silbernitrat gefällt. Der ausgewaschene Silberniederschlag wird samt dem Filter in Wasser aufgeschwemmt und mit Schwefelwasserstoff zersetzt. Der Schwefelsilberniederschlag wird abfiltriert und gut abgepresst; das Filtrat wird auf ein bestimmtes Volum gebracht und in einem Kolorimeter bestimmt durch Vergleich der Färbung mit der einer titrierten Rhodanlösung.

#### c) Jodometrisch.

Die jodometrische Bestimmung des Rhodans ist von Rupp und Schied ausgearbeitet, für die Bestimmung im Harn von Edinger und Treupel, Edinger und Clemens und deren Mitarbeitern zuerst angewandt worden.

Das Prinzip der Methode ist unter B. 10. auseinandergesetzt. Für den Harn gestaltet sie sich nach der Beschreibung von Edinger und Clemens<sup>3)</sup> folgendermassen.

#### Erfordernisse.

1. Salpetersäurehaltiges Wasser (1:100).
2. 3 % ige Silbernitratlösung.
3. Kieselgur; der gewöhnliche Kieselgur wird mit Salpetersäure angerührt, mehrmals mit Wasser durchgespült, getrocknet und in einem Silbertiegel geglüht.
4. Reines Natriumbicarbonat.
5. Jodkalium.
6.  $n_{10}$ -Jodlösung.
7.  $n_{10}$ -Natriumthiosulfatlösung.
8. 10 % ige Salzsäure.
9. 2 % ige Stärkelösung: 100 ccm Wasser werden in einem Becherglas zum Kochen erhitzt; 2 g reine lösliche Ozonstärke unter fortwährendem Umrühren langsam in das Wasser geschüttet und über der

<sup>1)</sup> J. Bruylants, Bull. de l'Acad. de méd. de Belgique (4) 2. 18; Jahresber. f. Tierchem. 1888. S. 135.

<sup>2)</sup> D. H. de Souza, Journ. of physiol. 35. 332. 1907.

<sup>3)</sup> A. Edinger und P. Clemens, Zeitschr. f. klin. Med. 59. 224. 1906.

Flamme etwa 5 Minuten verrührt. Die hergestellte Lösung muss opaleszierend sein und darf keine Stärketeilchen enthalten, bezw. muss filtriert werden.

#### Ausführung.

Eine klar filtrierte, bezw. durch Kochen vom Eiweiss befreite Harnmenge von 50—100 ccm wird in einem mässig grossen Becherglase mit stark verdünnter Salpetersäure angesäuert und mit einem Überschuss von Silbernitratlösung gefällt. Für 100 ccm Harn braucht man meist etwa 100 ccm Silbernitratlösung. Zur feineren Verteilung des Niederschlags setzt man eine Messerspitze Kieselgur zu und verrührt sie mit dem Niederschlag. Der Glasstab ist sorgfältig abzuspülen. Man lässt auf dem Wasserbad den Niederschlag (etwa 10 Minuten) gut absetzen, überzeugt sich, dass alles ausgefällt ist, und saugt durch eine mit Asbest belegte Siebplatte oder ein Papierfilter mit Platinkonus an der Pumpe ab. Das Filtrat muss vollkommen klar sein, eventuell mehrmals durchgesaugt werden. Der Niederschlag wird mehrmals mit salpetersäurehaltigem Wasser gewaschen und mit der Unterlage in ein 1 Liter fassendes Glasstopfenglas mit etwas Wasser gebracht.

Man gibt 3 g Natriumbicarbonat oder falls nötig noch mehr — bis zur alkalischen Reaktion — zu, dann 3 g Jodkalium, um das Chlorsilber in Jodsilber überzuführen, und löst durch sanftes Umschwenken das Bicarbonat und das Jodkalium. Man verteilt den Niederschlag mit einem Glasstab in der Flüssigkeit und lässt eine abgemessene Menge  $n/_{10}$ -Jodlösung bis zur deutlichen Braunfärbung zufließen (meist 20 ccm).

Die gut verschlossene Flasche wird 2—4 Stunden im Dunkeln gelassen, mit 10 % iger Salzsäure vorsichtig angesäuert, weil bei zu stürmischer Kohlensäureentwicklung Verluste an Jod eintreten und mit  $n/_{10}$ -Thiosulfatlösung unter Anwendung von Stärkelösung als Indikator bis zur Entfärbung zurücktitriert.

#### Berechnung.

Da beim Ansäuern 1 Molekül Jodcyan und 1 Molekül HJ sich nach der Gleichung

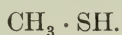


umsetzen, so entspricht ein Rhodan-Jon nicht 8 (s. B. 10.) sondern 6 Atomen Jod bei der Titration mit Thiosulfat; also  $\text{CNS}' = 58 = 6 \text{ J}$ ;  $\frac{\text{CSN}'}{6} = 9,67 = \text{J}$ ;  $\frac{\text{CNS}'}{60} = \frac{\text{J}}{10}$  g; d. h. 1000 ccm  $n/_{10}$  J = 0,967 g, oder 1 ccm  $n/_{10}$ -Jodlösung entspricht 0,967 mg Rhodan.

Die Kontrollproben im Harn mit Zusatz von Rhodankalium ergaben Verluste von 4–8 % des zugesetzten Rhodans. Der Kieselgurzusatz kann unterbleiben und durch einfaches Verrühren des Niederschlags mit dem Glasstab ersetzt werden.

Harnsäure geht bei der Fällung nach Edinger und Clemens nicht mit in den Niederschlag. Inwieweit Albumosen und andere pathologische Harnbestandteile die Genauigkeit der Bestimmung beeinflussen, ist nicht festgestellt.

## II. Methylmercaptan.



A. Vorkommen. Das Methylmercaptan ist von M. Nencki und Sieber, sowie Selitrenny als Fäulnisprodukt von Eiweiss und Leim, von Wohlgemuth speziell als Fäulnisprodukt des Cysteins erkannt worden. Nach L. Nencki findet es sich in den Dickdarmgasen. Wie zahlreiche Versuche von C. A. Herter<sup>1)</sup> gezeigt haben, bilden aërobe Mischkulturen von Bakterien aus den Fäces gesunder Menschen in Peptonlösungen Spuren von Methylmercaptan, beträchtlichere Mengen aber wurden nur aus den Fäceskulturen von pathologischen Fällen sehr verschiedener Art erhalten.

Aus Harn wurde das Mercaptan zuerst von M. Nencki nach Spargelgenuss gewonnen durch Destillation mit Oxalsäure. In der gleichen Weise isolierte es Rubner aus dem Harn nach Genuss von Blumenkohl, Teltower Rübchen und Rotkohl. Nach Rekowski, einem Schüler Nenckis, geht bei Kaninchen, die mit Methylmercaptan vergiftet werden, ein Teil unverändert in den Harn. Da Blumenkohl, Teltower Rübchen und Rotkohl schon beim Kochen mit Wasser das Mercaptan abgeben (Niemann<sup>2)</sup>), so handelt es sich hier wohl ebenfalls um unveränderten Übergang in den Harn, wofür auch der Geruch spricht. Dagegen riecht Harn nach Spargelgenuss anders als der Kaninchenharn nach der Mercaptanvergiftung, und Rekowski vermutet des-

<sup>1)</sup> M. Nencki und N. Sieber, *Monatsh. f. Chem.* **10**. 526. 1890. — L. Selitrenny, daselbst **10**. 908. — J. Wohlgemuth, *Zeitschr. f. physiol. Chem.* **43**. 469. 1905. — L. Nencki, *Monatsh. f. Chem.* **10**. 862. 1890. — C. A. Herter, *Journ. of biol. chem.* **1**. 421. 1906.

<sup>2)</sup> M. Nencki, *Arch. f. exper. Path. u. Pharm.* **28**. 206. 1891. — M. Rubner (mit F. Niemann und Stagnitta-Balistreri), *Arch. f. Hygiene* **19**. 136. 1893. — L. Rekowski, *Arch. des sciences biol.* **2**. 205. 1893. — F. Niemann, *Arch. f. Hygiene* **19**. 126. 1893.

halb, dass das von Nencki nachgewiesene Methylmercaptan wohl erst durch Zersetzung einer anderen schwefelhaltigen Verbindung bei der Destillation mit Oxalsäure entstanden sei.

Karplus<sup>1)</sup> sah das Mercaptan im Harne bei der Vegetation eines Schwefelwasserstoff bildenden Bakteriums in demselben auftreten.

### B. Eigenschaften.

Das Methylsulphydrat ist von Klason<sup>2)</sup> in reinem Zustand dargestellt und von ihm, sowie von Rubner in Gemeinschaft mit Niemann und Stagnitta-Balistreri untersucht worden.

1. Farblose, widerlich riechende, bei  $5,8^{\circ}$  siedende Flüssigkeit, bei gewöhnlicher Temperatur also gasförmig (Kl.). Nach Carrara und Coppadoro<sup>3)</sup> liegt der Siedepunkt bei  $20^{\circ}$ .

2. Verbindet sich mit Metallen. Eine Lösung des Mercaptans in Alkalihydrat besitzt nur einen schwachen Geruch. Mit den schweren Metallen bildet es Niederschläge.

a) Bleimercaptid.  $(\text{CH}_3.\text{S})_2\text{Pb}$ , entsteht als krystallinischer zitronengelber Niederschlag beim Einleiten des Gases in eine Bleiacetatlösung (K.) oder beim Mischen einer alkalischen Mercaptanlösung mit Bleiacetat (R.). Verwandelt sich meist in bräunliche Tafeln (R.). In Wasser, Alkohol, Äther unlöslich, aber in erheblichem Masse löslich in Bleiacetatlösung (R.). Beim Waschen mit Alkohol werden die braunen Krystalle etwas dunkler, beim Waschen mit Äther zitronengelb (R.). In trockenem Zustand gegen Wärme sehr widerstandsfähig (R.), zerfällt aber beim Erhitzen zuletzt in Methylsulfid und Schwefelblei (K.). Geht in feuchtem Zustand in das Mercaptan und in Bleihydrat über (K.) und zersetzt sich in dieser Weise vollständig beim Kochen mit Wasser (R.). Mineralsäuren entwickeln aus ihm das Mercaptan (K.). Im Licht wird die Verbindung nach Klason geschwärzt, nach Rubner dagegen nicht. — Bei gleichzeitiger Gegenwart von Schwefelwasserstoff ist der Niederschlag rötlich oder rötlich braun und wird leicht schwarz (R.). Bleipapier färbt sich in dem Gase gelbbraunlich, dann bald braun und endlich schwarz (R.).

b) Quecksilbermercaptid.  $(\text{CH}_3.\text{S})_2\text{Hg}$  fällt beim Einleiten des Gases in eine Quecksilbercyanidlösung in Form mikroskopischer vierseitiger Prismen (K.); der Niederschlag ist weiss und einer Kalkseife ähnlich (R.). Die Fällung ist auch in Gegenwart von viel Quecksilbercyanid nahezu vollständig (R.). Beinahe unlöslich in Methyl- und in Äthylalkohol. Schmilzt bei  $175^{\circ}$  unter Zersetzung. Wird durch Salzsäure in der Kälte zu  $\text{CH}_3.\text{S} - \text{HgCl}$  zersetzt, wobei die Hälfte des Mercaptans frei wird. Dieselbe Verbindung entsteht auch als körniger Niederschlag bei der Einwirkung des Mercaptans auf Quecksilberchlorid. Bei der Behandlung des Quecksilbermercaptids mit essigsaurem Quecksilber geht dasselbe nach Bertram<sup>4)</sup> als eine Verbindung von 1 Mol. Mercaptid mit 2 Mol. Quecksilberacetat in Lösung; Quecksilberchlorid schlägt aus der Lösung nahezu alles Mercaptan in Form der chlorhaltigen Verbindung nieder.

c) Goldchlorid, Platinchlorid, Palladiumchlorid werden durch das Mercaptan sofort gefällt, Palladium besonders leicht in Gegenwart von etwas Salpetersäure. Der Platinniederschlag löst sich in Alkohol und in Äther. Die Palladiumverbindung  $(\text{CH}_3.\text{S})_2\text{Pd}$  wird bei Erhitzen heller, ziegelrot. Das Goldsalz hat die Zusammensetzung  $(\text{CH}_3.\text{S})_3\text{Au}$  (R.).

<sup>1)</sup> J. P. Karplus, Virchows Arch. 131. 221. 1893.

<sup>2)</sup> P. Klason, Bericht d. chem. Gesellsch. 20. 3408. 1887.

<sup>3)</sup> G. Carrara u. A. Coppadoro, Gazz. chim. ital. 33. I. 329. 1903. zit. n. Chem. Zentralbl. 1903. II. 615.

<sup>4)</sup> A. Bertram, Berichte der chem. Gesellsch. 25. 64. 1892.



d) Es sind auch ähnliche unlösliche Verbindungen des Mercaptans mit Wismuth, Silber (K.) und Kupfer (R.) dargestellt worden. Eisensalze, auch organische, geben mit dem Mercaptan keine Niederschläge (R.).

### 3. Farbenreaktionen.

a) Isatinschwefelsäure (eine Auflösung von Isatin in konzentrierter Schwefelsäure) wird nach Denigès<sup>1)</sup> durch Methylmercaptan, wie durch die Mercaptane überhaupt, schön grün gefärbt. Die Alkylsulfide, schweflige Säure, Schwefelwasserstoff geben diese Reaktion nicht, die höheren Aldehyde oder Alkohole zerstören oder verdecken die Färbung.

b) Eine alkalische Nitroprussidnatriumlösung wird durch Methylmercaptan (und andere Mercaptane) violettrot (Denigès)<sup>1)</sup>. Beim Stehen, sowie beim Ansäuern mit organischen oder anorganischen Säuren wird die Probe (mit Äthylmercaptan) nach v. Bittó<sup>2)</sup> gelb, die angesäuerte Probe beim Übersättigen mit Alkali wieder violettrot. Die Färbung ist gleich der durch Sulfide hervorgerufenen. Die Alkylsulfide und die schweflige Säure sind nach Denigès ohne Einwirkung auf das Reagens, nach v. Bittó wird es aber durch Äthylsulfid rot.

c) Durch Jod wird das Methylhydrosulfid nach Rubner<sup>3)</sup> zu Disulfid oxydiert:  $2 \text{CH}_3\text{SH} + \text{J}_2 = \text{CH}_3\text{S} \cdot \text{S} \cdot \text{CH}_3 + 2 \text{HJ}$ . Diese Reaktion ist zur quantitativen Bestimmung des Mercaptans geeignet.

C. Nachweis. Auf den Geruch allein darf man sich beim Nachweis des Mercaptans nicht verlassen. Die Reagentien sind von ungleichem Werte; am wenigstens empfindlich ist nach Rubner eine konzentrierte Bleizuckerlösung wegen der Löslichkeit des Bleimercaptids im Reagens, besser geeignet ist eine 3%ige Bleiacetatlösung; dann folgen, mit zunehmender Empfindlichkeit, eine mit wenig Salzsäure versetzte Quecksilbercyanidlösung, Isatinschwefelsäure, Gold- und Platinchlorid. Diese Edelmetalle zeigen noch den hundertsten Teil der durch konzentrierte Bleizuckerlösung erkennbaren Menge an. Die geringste noch nachweisbare Menge beträgt 0,06 mg. Über die Empfindlichkeit des Nitroprussidnatriums liegen keine Erfahrungen vor. Um ungefähr 50 ccm der roten Isatinlösung in 10 Minuten tief grün zu färben, genügen 25 mg einer 1%igen Methylmercaptanlösung (Herter<sup>4)</sup>).

Bei dem Nachweis des Mercaptans im Harn verfuhr M. Nencki in der Weise, dass er den gesamten zur Verfügung stehenden Harn nach reichlichem Zusatz von Oxalsäure der Destillation unterwarf und die entweichenden Gase durch eine 3%ige Quecksilbercyanidlösung leitete. Der entstandene Niederschlag wurde gewaschen und mit einigen Kubikzentimetern 5%iger Salzsäure aus einem Reagenzglas destilliert. In der vorgelegten Bleiacetatlösung entstand an den Wänden des Gasleitungsrohres wie am Boden des Gefäßes ein gelber krystallinischer Niederschlag.

<sup>1)</sup> G. Denigès, Comptes rendus **108**. 350. 1889.

<sup>2)</sup> B. v. Bittó, Annal. d. Chem. **267**. 379. 1892.

<sup>3)</sup> Rubner, a. a. O. S. 154.

<sup>4)</sup> Rubner, a. a. O. S. 145. — Herter, a. a. O. S. 422.

Rubner empfiehlt das Durchsaugen von Luft während der Destillation für die vollständige Gewinnung des Mercaptans. Den Dampf kondensiert er durch ein Kühlrohr, sammelt das Destillat in einer Woulffschen Flasche auf und lässt nur das Gas durch die Quecksilberlösung streichen; nach Beendigung der Destillation muss aber noch Luft durch die Flüssigkeit in der Vorlage getrieben werden. — Nachdem Nencki von dem Harn ungefähr 50 ccm abdestilliert hatte, nahm der Niederschlag nicht mehr zu.

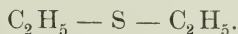
Die Quecksilbereyanidlösung kann gesättigt sein. Für die vollständige Absorption des Mercaptans ist als Vorlage ein Kölbchen oder ein (Péligotsches) U-Rohr nicht geeignet. Rubner verwendet dazu ein Pettenkofersches Barytrohr (ein schräg liegendes langes und weites Rohr). Ein Kugelapparat dürfte dasselbe leisten. Der Quecksilberniederschlag braucht nicht weiss zu sein, wie bei der Bildung desselben aus reinem Mercaptan; mitgefälltes Schwefelquecksilber bleibt aber bei der nachfolgenden Destillation mit Salzsäure unersetzt zurück.

Charakteristisch für das Mercaptan ist die gelbe Farbe und die krystallinische Beschaffenheit (Tafeln und Prismen) des Bleiniederschlags. Da das Bleimercaptid in Bleiacetatlösung löslich ist, so entgeht ein Teil des Sulphydrats dem Nachweis. Nach Rubner ist eine 3 %ige Bleiacetatlösung die geeignetste. Für eine Bleibestimmung im Niederschlag dürfte die Menge desselben nur selten ausreichen. Man führt sie aus, indem man den Niederschlag mit Schwefelsäure benetzt, die Schwefelsäure abraucht und den Rückstand glüht. Bleimercaptid enthält 68,76 % Pb und liefert 100,66 %  $\text{PbSO}_4$ .

Die Isatinschwefelsäure wendet man zum Nachweis des Methylmercaptans nach Rubner am besten in der Weise an, dass man das mittelst Chlorcalcium getrocknete Gas über Tontäfelchen streichen lässt, welche mit der Isatinschwefelsäure getränkt sind. Der von der Isatinschwefelsäure gelbrötliche Ton färbt sich bei Gegenwart des Mercaptans grün; später geht die Farbe in graublau über. Lässt man das Gas in die Isatinschwefelsäure selbst eintreten, so nimmt man die Grünfärbung am besten da wahr, wo die Flüssigkeit eine dünne Schicht bildet (am Gasleitungsrohr, an der Wand des Gefässes). Aus dem Reagens lässt sich nach dem Verdünnen ein Teil des Mercaptans durch Destillation wieder gewinnen.

Bei der Verwendung alkalischer Nitroprussidnatriumlösung schliesst man einen Irrtum durch gleichzeitig auftretenden Schwefelwasserstoff nach Denigès in der Weise aus, dass man die Nitroprussidlösung mit etwas einer Auflösung von Bleihydrat in Natron- oder Kalilauge versetzt. Der Schwefelwasserstoff wird dann als Schwefelblei abgeschieden.

### III. Äthylsulfid.



A. Vorkommen. Die widerlich riechende Substanz, welche auf Zusatz von Kalkmilch oder Alkalihydrat zu Hundeharn auftritt, ist nach der erschöpfenden Untersuchung von Abel Äthylsulfid (nach dem chemischen Verhalten ist auch Methyläthylsulfid nicht ausgeschlossen). Die Verbindung, aus welcher das Sulfid entsteht, ist nach Neuberg und Grosser Diäthylmethylsulfoniumhydroxyd  $(\text{C}_2\text{H}_5)_2 \cdot \text{S} \cdot (\text{CH}_3) \cdot \text{OH}$  (siehe S. 115), das seinerseits nach Aufnahme von Äthylsulfid durch Methylierung entstehen und im Harn als Salz ausgeschieden werden soll. Die Entstehung von Äthylsulfid bei der Fäulnis von Cystein ist von

Wohl gemuth<sup>1)</sup> nachgewiesen. Nach der Fütterung mit Fleisch allein scheint der Harn mehr Äthylsulfid zu liefern als nach gemischtem Futter (Abel).

### B. Eigenschaften.

Von den Eigenschaften der Substanz wird hier nur so viel erwähnt, als zur Kennzeichnung derselben und für ihren Nachweis erforderlich ist. Abel hat einige neu aufgefundene Eigenschaften des Harnsulfids mit denen des synthetisch erhaltenen Sulfids verglichen.

1. Das Äthylsulfid bildet eine eigentümlich unangenehm riechende, bei 91—92° siedende Flüssigkeit. Der unangenehme Geruch scheint auf einer Verunreinigung zu beruhen. Durch 6—8 stündiges Erhitzen mit Kupferpulver auf 260—280° verliert es nach Finckh<sup>2)</sup> den widerlichen Geruch und riecht dann ähnlich wie stark verdünnter Äther. Es löst sich nur wenig in reinem oder in angesäuertem Wasser, wird aber von konzentrierter Schwefelsäure in ziemlich grosser Menge gelöst. Diese Lösung ist geruchlos, entwickelt aber beim Eintragen von Eis in dieselbe oder beim Verdünnen mit 4%iger auf 0° abgekühlter Schwefelsäure den Geruch nach dem Sulfid.

2. Eine wässrige, alkoholische oder ätherische Lösung des Äthylsulfids gibt mit Quecksilberchlorid einen aus Nadeln bestehenden Niederschlag, der nach dem Waschen mit Wasser und mit Alkohol aus wenig heissem Alkohol in langen, schmalen, stark lichtbrechenden Prismen krystallisiert.  $(C_2H_5)_2S$ ,  $HgCl_2$ . Die reine Verbindung schmilzt bei 119° (Abel); aus den geschmolzenen, farblosen Tropfen schiessen beim Erkalten schöne, lange Prismen hervor. An der Luft verlieren die Krystalle und über Schwefelsäure auch die gepulverte Substanz Äthylsulfid unter Erhöhung des Schmelzpunktes.

3. Äthylsulfid verbindet sich nach Letts leicht mit Bromessigsäure zu dem Bromid der Äthylsulfinessigsäure  $Br-(C_2H_5)_2S \cdot CH_2 \cdot COOH$ , einem Thetin, nach Drechsel<sup>3)</sup> auch wenn sich die Bromessigsäure in wässriger Lösung befindet. Die Lösung des Bromids lässt sich nach Drechsel einige Zeit ohne Zersetzung kochen, entwickelt aber beim Kochen mit Natronlauge Äthylsulfid; aus seiner Lösung wird das Bromid durch Phosphorwolframsäure gefällt.

4. Leitet man den Dampf des Sulfids zugleich mit Sauerstoff durch glühenden Asbest, so bildet sich Schwefelsäure.

<sup>1)</sup> J. J. Abel, Zeitschr. f. physiol. Chem. **20**. 253. 1894. — C. Neuberg und Grosser, Zentralbl. f. Physiol. **19**. 316. 1905. — J. Wohl gemuth, Zeitschr. f. physiol. Chem. **43**. 469. 1905.

<sup>2)</sup> J. Finckh, Ber. d. Chem. Ges. **27**. 1239. 1894.

<sup>3)</sup> E. A. Letts, Jahresber. f. Chem. 1878. S. 683. — E. Drechsel, Zentralbl. f. Physiol. **10**. 529. 1896.



5. Versetzt man eine Lösung des Sulfids unter gleichzeitigem Verdünnen mit einer konzentrierten Permanganatlösung und vollendet die Reaktion zuletzt durch Erwärmen, so entsteht Essigsäure und Schwefelsäure; die Essigsäure wird dabei teilweise zu Kohlensäure weiter oxydiert.

6. Durch Salpetersäure von 1,2 Dichte wird das Äthylsulfid zu Äthylsulfoxyd  $(C_2H_5)_2SO$  oxydiert, in freiem Zustand eine dickflüssige, in Wasser leicht lösliche, leicht zersetzliche Verbindung, aus welcher sich durch Zink und Schwefelsäure das Sulfid wieder herstellen lässt. Durch rauchende Salpetersäure wird das Sulfid dagegen zu Diäthylsulfon  $(C_2H_5)_2SO_2$  oxydiert; rhombische, in Wasser leicht lösliche Tafeln vom Schmelzpunkt  $70^\circ$  und Siedepunkt  $248^\circ$ ; diese Verbindung liefert beim Behandeln mit Zink und Schwefelsäure das Sulfid nicht wieder.

7. Mit Brom und mit Jod bildet das Sulfid die dem Sulfoxyd analogen Verbindungen  $(C_2H_5)_2SBr_2$  und  $(C_2H_5)_2SJ_2$ .

a) Setzt man nach Abel einige Tropfen einer ungefähr 2%igen Lösung von Brom in Bromkalium zu einer Lösung des Sulfids in konzentrierter Schwefelsäure, oder rührt man Bromdampf in die vorher mit einigen Tropfen Wasser verdünnte schwefelsaure Lösung, so wird in einiger Zeit, bei Gegenwart von etwas grösserer Menge Sulfid erst in einigen Tagen, das Sulfid vollständig in die Bromverbindung übergeführt. Die Mischung riecht nach dem Verdünnen nicht mehr nach dem Sulfid; Zink macht aber das Sulfid wieder frei. Fügt man der bromhaltigen Lösung Jodkalium hinzu, so scheidet sich das schwarze ölige Jodid ab.

b) Die Verbindung des Sulfids mit Jod erhält man direkt, wenn man der Lösung des Sulfids in Schwefelsäure einige Tropfen einer ungefähr 0,05 normalen Lösung von Jod in Jodkalium hinzusetzt. Es bildet sich ein äusserst fein verteilter Niederschlag, der lange suspendiert bleibt, sich aber endlich in Form schwarzbrauner, ölicher Tröpfchen absetzt. Dieser Niederschlag löst sich nicht in Wasser, entwickelt aber in Berührung mit Wasser den Geruch nach dem Sulfid. Lauge löst den Niederschlag farblos gleichfalls unter Rückbildung des Sulfids.

Diese Reaktion tritt in Gestalt einer schimmernden Wolke noch mit Spuren Äthylsulfid ein, mit der geringen Menge Sulfid, die sich beim Schütteln von 50 cem Wasser mit 1–2 Tropfen des Sulfids löst, oder mit dem Destillat mit Kalkmilch versetzten Hundeharns. — Eine ähnliche wolkige Trübung geben mit dem Reagens nach Abbott auch wässrige Lösungen primärer Amine.

8. Salpetrige Säure färbt eine Lösung von Äthylsulfid in Schwefelsäure tief grün; die Färbung verschwindet beim Stehen der Mischung oder durch einen Überschuss von salpetriger Säure. Die grüne Lösung entwickelt beim Verdünnen noch den Geruch des Sulfids, die farblos gewordene aber erst nach der Behandlung mit Zink.

Man kann die Reaktion mit der Lösung eines Nitrits anstellen, zweckmässiger aber ist die Anwendung von Nitrososchwefelsäure, weil man mit dieser weniger Gefahr läuft, durch einen Überschuss die Färbung zu zerstören. Dieses Reagens erhält man nach Liebermann<sup>1)</sup>, indem man in englische Schwefelsäure ungefähr 8% eines Nitrits einträgt, 6–7% Wasser hinzufügt und das auskristallisierte Produkt auf Glaswolle abfiltriert.

<sup>1)</sup> C. Liebermann, Berichte d. chem. Gesellsch. 20. 3232. 1887.



Die Reaktion ist nicht sehr empfindlich und gelingt gut nur mit derjenigen Menge Sulfid, die man nach dem unter C beschriebenen Verfahren in einem vollen Tag aus 5—6 Liter Hundeharn gewinnen kann.

Das Liebermannsche Reagens gibt eine ähnliche Färbung mit Thiophen; aber hier geht die Grünfärbung bald in blau, dann in purpur über. Mit einer Lösung von Thiophen in Schwefelsäure versagt die Reaktion bald, weil sich Thiophen-sulfonsäure bildet. Übrigens fehlt beim Thiophen der Geruch des Äthylsulfids. — Die Mercaptane geben die Reaktion nicht.

C. Darstellung. Man entzieht Hundeharn, der mit Kalkmilch versetzt ist, durch einen Luftstrom das Sulfid und fängt es in konzentrierter Schwefelsäure auf. Die aus dem Harn austretende Luft muss von anderen Beimengungen befreit und sorgfältig getrocknet werden, weil schon mässig verdünnte Schwefelsäure das Sulfid erheblich schlechter bindet wie konzentrierte. Auch soll die Luft in den mit der Schwefelsäure beschickten Geisslerschen Apparat nur mit einer Geschwindigkeit wie bei der Elementaranalyse eintreten, weil sonst Verluste stattfinden können.

Abel leitet die mittelst einer Saugpumpe durch den Harn getriebene Luft durch zwei Waschflaschen mit 10 %iger Salzsäure, dann durch zwei Waschflaschen mit 40 %iger Natronlauge, durch ein 30 cm hohes, 2,5 cm weites U-Rohr mit Kalihydratstücken, durch ein ebensolches Rohr mit granuliertem Chlorealcium und dann erst in die Schwefelsäure.

Abel hat das Gas aus zwei Waschapparaten mittelst eines T-Rohrs durch einen Geisslerschen Apparat geleitet, immer nur 2 Liter Harn auf einmal verwendet, diesen aber gewechselt und in 72 Stunden 15—20 Liter Harn verarbeitet. Die Ausbeute ist jedoch nur mässig.

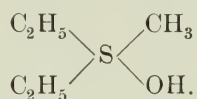
Vielleicht lässt sich eine wässrige Lösung von Bromessigsäure mit mehr Vorteil zum Auffangen des Sulfids verwenden.

D. Nachweis. Auffällig ist das Äthylsulfid schon durch seinen widerlichen Geruch; vgl. indessen dazu die Beobachtung von Finckh (B. 1.), die Abel noch nicht bekannt war. Von Reaktionen sind namentlich zwei hervorzuheben, die mit Jod und die mit salpetriger Säure. Am empfindlichsten ist die Reaktion mit Jod (B. 7. b), doch ist sie, da primäre Amine eine ähnliche geben, nur bei Abwesenheit solcher auf die Gegenwart von Äthylsulfid zu beziehen. Nach Schiffer<sup>1)</sup> entwickelte Hundeharn mit Kalkmilch Methylamin, und das Auftreten der Jodreaktion in solchem, nicht weiter gereinigten Harndestillat wäre somit für die Gegenwart des Äthylsulfids nicht beweisend. Die Reaktion mit salpetriger Säure (B. 8.) erfordert grössere Mengen Substanz und kann durch einen Überschuss an Reagens leicht verdorben werden; doch kann man sie bei vorsichtiger Verwendung der Nitrososchwefelsäure auch noch mit geringeren Mengen Äthylsulfid, wie in dem angeführten Beispiel, erhalten. Die Quecksilberchloridverbindung liesse sich aus Harn zwar leicht, aber nur schwer in genügend reinem Zustande erhalten.

<sup>1)</sup> Schiffer, Ztschr. f. physiol. Chem. 4. 237. 1850.

Die Schwefelsäure, welche das Harnsulfid aufgenommen hatte, verdünnte Abel unter Abkühlung mit 4 % iger Schwefelsäure so weit, dass sie nur noch 30 % Säure enthielt, schüttelte mit Äther aus, wusch den Äther zweimal mit Wasser, versetzte ihn mit alkoholischer Quecksilberchloridlösung, dampfte erst auf dem Wasserbad auf zwei Drittel ein und trocknete vollends im Vacuum. Der stark nach Äthylsulfid riechende Rückstand wurde durch Waschen vom überschüssigen Quecksilberchlorid befreit, abermals über Schwefelsäure getrocknet und in wenig heissem Alkohol gelöst. Es schieden sich lange schmale stark glänzende Prismen aus, die noch mit amorpher Substanz verunreinigt waren. Sie schmolzen nach dem Trocknen, nicht wie die reine Verbindung bei 119°, sondern einmal bei 145°, ein andermal bei 150°, und zwar zu schwarzen Tropfen. Aus diesen schossen jedoch, wie aus der geschmolzenen reinen Verbindung, beim Erkalten lange Prismen hervor.

#### IV. Diäthylmethylsulfoniumbase.



Über die Verbindung, welche die Muttersubstanz des im Hundeharn nach Alkalizusatz auftretenden Äthylsulfids sein und in welche verfüttertes Äthylsulfid übergehen soll, liegt bisher nur folgende kurze Mitteilung von Neuberg und Grosser<sup>1)</sup> vor:

Sie wird aus dem Harn durch Phosphorwolframsäure gefällt und kann durch Zersetzung des Niederschlags mit Schwefelsäure oder Salzsäure durch Wismutkaliumjodid ausgefällt werden und erwies sich als Diäthylmethylsulfoniumbase.

Die ausführliche Mitteilung ist bisher nicht erschienen (s. S. 115).

<sup>1)</sup> Neuberg und Grosser, Zentralbl. f. Physiol. **19**, 316. 1905. (Bericht über d. Verh. d. deutschen physiol. Gesellsch. II. Tagung.)

# Aromatische Verbindungen.

Von A. Ellinger-Königsberg i. Pr.

## Phenole.

Im normalen Harn des Menschen und der Tiere, namentlich der Pflanzenfresser, kommen mehrere Phenole vor, vorzugsweise Phenol, Parakresol und Brenzkatechin. Das Parakresol macht nach Baumann und Mooser weitaus die Hauptmenge der Phenole im Pferde-, Rinder- und auch im Menschenharn aus. Siegfried und Zimmermann<sup>1)</sup> fanden durchschnittlich im Gemisch der flüchtigen Phenole des Menschenharns etwa 58% Kresol und 42% Phenol.

Die Phenole werden nicht als solche, sondern der Hauptsache nach als Ätherschwefelsäuren (s. S. 87), wie zuerst Buliginzky und Hoppe-Seyler<sup>2)</sup> dargetan haben, und in kleinerer Menge als Glycuronsäureverbindungen ausgeschieden. An die isocyclischen Phenole schliesst sich das Indoxyl an. Auch ein geringer Teil der aromatischen Oxyssäuren ist an Schwefelsäure gebunden.

Das Phenol, welches in dem ursprünglich phenolfreien Pferdeharn bei der Fäulnis desselben als solches auftritt, verdankt seinen Ursprung nicht der Phenolätherschwefelsäure, sondern den beiden aromatischen Oxyssäuren, dagegen wird bei der Fäulnis der Brenzkatechinschwefelsäure Brenzkatechin frei (Preusse). Die unter normalen Verhältnissen im Harn auftretenden Phenole entstehen entweder bei der Fäulnis von Eiweiss im Darm und, unter pathologischen Verhältnissen, an anderen Körperstellen oder entstammen Benzolderivaten der Pflanzennahrung (Baumann). Über den Übergang von Benzol und Benzolderivaten in Phenole, die der Paarung mit Schwefelsäure und Glycuronsäure fähig sind, s. das Kap. „Körperfremde Stoffe“. Dem Körper direkt zugeführte Phenole erscheinen im Harn als Ätherschwefelsäuren und verursachen eine Vermehrung dieser auf Kosten der Sulfat-schwefelsäure (S. 87). Daneben wird stets ein Teil als gepaarte Glycuron-

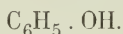
<sup>1)</sup> E. Baumann, Zeitschr. f. physiol. Chem. 6. 183. 1882. — W. Mooser, ebenda 63. 155. 1909. — M. Siegfried und R. Zimmermann, Biochem. Zeitschr. 34. 471. 1911.

<sup>2)</sup> A. Buliginzky, Hoppe-Seyler's med.-chem. Untersuchungen 1866. S. 234. F. Hoppe-Seyler, Pflüger's Archiv 5. 470. 1872.

säure ausgeschieden. Ist die verfügbare Schwefelsäure zur Bindung der Phenole erschöpft, so wird die Paarung mit Glycuronsäure noch ausgiebiger (Baumann, Schmiedeberg, Fenyvessy und Kabdebo). Nach den quantitativen Untersuchungen von C. Tollens und F. Stern<sup>1)</sup> verhalten sich die verschiedenen Phenole hinsichtlich ihrer Paarung verschieden. Phenol paart sich vorzugsweise mit Glycuronsäure, Indoxyl mit Schwefelsäure. Bei Kresolvergiftungen werden Glycuronsäure und Schwefelsäure in ausgedehntem Masse zur Entgiftung gleichzeitig herangezogen.

Die von Baumann entdeckten und namentlich von ihm untersuchten Phenolätherschwefelsäuren sind nicht flüchtig, werden von Essigsäure nicht angegriffen, aber von Mineralsäuren in die betreffenden Phenole und Schwefelsäure zersetzt. Auch die Phenolglycuronsäuren werden durch Säuren in ihre Bestandteile zerlegt. Von den freien Phenolen sind die einatomigen (Phenol, die Kresole) flüchtig, die mehratomigen (Brenzkatechin, Hydrochinon) dagegen nicht.

## I. Phenol.



Syn. Carbolsäure.

A. Vorkommen. Phenol ist zuerst von Staedeler im Kuhharn aufgefunden worden. Im Menschenharn sind nur geringe Mengen Phenol — worunter hier stets das aus den gepaarten Schwefel- und Glycuronsäuren frei gemachte Gemenge von Phenol und p-Kresol verstanden ist — vorhanden, in der Tagesmenge nach Munk 0,017—0,51 g, im Mittel nach Munk, Neuberg und Mooser 0,03 g, nach Kossler und Penny<sup>2)</sup> 0,07—0,106 g bei gemischter Kost, reichlicher nach Pflanzennahrung, im Hunger nach Munk nicht weniger als nach Nahrungsaufnahme. Im Harn der Pflanzenfräser finden sich bei weitem grössere Mengen Phenol.

J. Munk fand in 1 Liter Pferdeharn 0.913 g, E. Salkowski 1.2 g; im Liter Kuhharn schwankten die Werte des p-Kresols — Phenol war nicht vorhanden —

<sup>1)</sup> Preusse, Ztschr. f. physiol. Ch. **2**. 334. 1878. — E. Baumann, Pflüger's Archiv **13**. 299. 1876. — O. Schmiedeberg, Archiv f. exper. Pathol. **14**. 306. 1881. — B. v. Fenyvessy, Magyar Orvosi Archivum **6**. 1. zit. n. Jahrb. f. Tierchem. **35**. 726. — B. v. Fenyvessy u. G. v. Kabdebo ebenda **7**. 399, zit. n. Jahrb. f. Tierchem. **36**. 633. — C. Tollens, Ztschr. f. physiol. Ch. **67**. 138. 1910. — F. Stern, ebenda **68**. 52. 1910.

<sup>2)</sup> Staedeler, Ann. d. Chem. u. Pharm. **77**. 17. — J. Munk, Du Bois' Archiv 1880. Suppl. 23; Virchow's Archiv **131**. Suppl. 110. 1893. — C. Neuberg, Ztschr. f. physiol. Chem. **27**. 123. 1899. — W. Mooser, ebenda **63**. 176. 1909. — A. Kossler und E. Penny, Ztschr. f. physiol. Ch. **17**. 139. 1892.



zwischen 0.25 und 0.77 g in den Bestimmungen Moosers. Im Harn eines mit Fleisch und Speck gefütterten Hundes fand Jonescu<sup>1)</sup> keine Phenole.

In Krankheiten vermehrt ist das Phenol nach E. Salkowski sowie nach L. Brieger bei Stauungen des Darminhalts, namentlich in den unteren Teilen des Dünndarms und im Dickdarm, bei Peritonitis, bei Eiterungen, besonders wenn der Eiter stinkend wird, bei Pyämie, nach Blendermann<sup>2)</sup> bei der Phosphorvergiftung. Indicanreicher Harn enthält auch zugleich viel Phenol, phenolreicher ist aber nicht immer reich an Indican.

Diese Tatsache ist wohl so zu erklären, dass nicht alle Bakterien, die bei der Zersetzung von Eiweiss Indol bilden, auch Phenol liefern (Lewandowski<sup>3)</sup>).

Strasser erhielt mittelst des Verfahrens von Kossler und Penny in der Tagesmenge Harn bei schwerer Anämie, Phosphorvergiftung, Ileus, Cystitis, Lebercirrhose 36—50 mg, bei putriden Bronchitis 51, Peritonitis 56, lienaler Leukämie 62—81, Diabetes ohne Aceton 91, Gesichtserysipel 96, Nitrobenzolvergiftung 97, Pneumonie im Mittel aus 4 Beobachtungen 110 (68—188), Typhus während des Fiebers 142, 176 und 235, nach Ablauf des Fiebers 35—59, Pyopneumothorax 194, Gangrän des Fusses 261 mg. Bei Diabetes mit viel Aceton und Acetessigsäure wurden 287 (177—694) mg ermittelt; hier ist offenbar das Aceton mit bestimmt worden. — Russo fand bei der Untersuchung des Harns von 30 Kranken 225 mg als Maximum in der Tagesmenge. Bei Lebercirrhose ohne Icterus vermehrte er, wohl wegen Unzulänglichkeit des Verfahrens, das Phenol vollständig, bei Lungentuberkulose war es nur spärlich oder gar nicht nachweisbar. Bei Erkrankungen des Darms war es nur bei gleichzeitiger Stauung des Darminhalts vermehrt. Bei Diabetes mellitus fand sich am meisten, bei Diabetes insipidus keins. — C. A. Herter und Wakeman<sup>4)</sup> erhielten bei Diabetikern Phenolmengen bis zu 0.79 g.

Bei der Beurteilung der angeführten Zahlen ist in Betracht zu ziehen, dass bei den Bestimmungen, die vor der Arbeit von Neuberg liegen, durch die Anwesenheit von Kohlehydraten zu hohe Werte gefunden sein können.

Im Harn der Neugeborenen finden sich keine oder nur wenig Phenole (Senator u. a.), weil bei ihnen der Darminhalt steril ist (Schild), ebenso wenig im Harn von Tieren, deren Darm steril erhalten wurde (Nuttall und Thierfelder). Im Säuglingsharn fand L. F. Meyer<sup>5)</sup> bei Brustkindern 4.19 mg, bei künstlicher Ernährung 13.28 mg als Mittel in der Tagesmenge.

Lewin fand vermehrte Phenolausscheidung bei kachektischen Krebskranken und vermehrtem Eiweisszerfall infolge von Phloridzininjektionen. Auf Grund dieser Resultate tritt er dafür ein, dass Phenol auch im intermediären Stoffwechsel

<sup>1)</sup> E. Salkowski, ebenda 42. 213. 1904. — D. Jonescu, Biochem. Ztschr. 1. 403. 1906.

<sup>2)</sup> E. Salkowski, Ber. d. chem. Ges. 9. 1595. 1876 u. 10. 842. 1877. L. Brieger, Ztschr. f. physiol. Ch. 2. 241. 1878. — Blendermann, Ztschr. f. physiol. Ch. 6. 240. 1882.

<sup>3)</sup> A. Lewandowski, Deutsche med. Wochenschr. 51. 1186. 1890.

<sup>4)</sup> A. Strasser, Ztschr. f. klin. Med. 24. 543. 1894. — A. Russo, Rivista clin. e terap. October 1888; Centralbl. f. klin. Med. 10. 306. — C. A. Herter u. Wakeman in C. v. Noorden's Handb. d. Pathol. d. Stoffwechsels II. 111. Berlin 1907

<sup>5)</sup> H. Senator, Ztschr. f. physiol. Ch. 4. 1. 1879. — W. Schild, Ztschr. f. Hygiene 19. 113. 1895. — G. H. F. Nuttall u. H. Thierfelder, Ztschr. f. physiol. Ch. 21. 73. 1896. — L. F. Meyer, Monatsschr. f. Kinderheilkunde 4. 344. zit. n. Jahresb. f. Tierchem., 36. 632.

ohne Mitwirkung von Bakterien entstehen könne. P. Mayer und Scholz<sup>1)</sup> konnten im Tierversuch die Resultate Lewins nach Phloridzininjektion nicht bestätigen.

B. Eigenschaften. 1. Das reine Phenol krystallisiert in langen, farblosen Nadeln, schmilzt bei 43°, siedet bei 182—183°, löst sich schwer in kaltem Wasser, leicht in heissem, ist mit Alkohol und mit Äther in jedem Verhältnisse mischbar. Seine wässrige Lösung färbt Lackmus nicht, oder nur schwach rot. Es destilliert leicht mit Wasserdampf über.

Petroläther nimmt nach Jacobson<sup>2)</sup> beim Schütteln in der Kälte nur Spuren von Phenol auf, dagegen geht es reichlich in Äther, Essigäther, Benzol und Chloroform über. Die Benzol- und Ätherrückstände geben die schönsten Reaktionen; das Benzol verdient den Vorzug, weil es sich vollständig vom Wasser trennt.

2. Das Phenol löst sich leichter als in Wasser in Lösungen der Alkalihydrate und der Hydrate der alkalischen Erden und bildet mit diesen salzartige Verbindungen von stark alkalischer Reaktion.

Die Verbindungen werden durch Kohlensäure oder doppelt kohlensaure Salze unter Abscheidung des Phenols zersetzt. Die kohlensauren Alkalien werden vom Phenol nicht bei gewöhnlicher Temperatur, wohl aber in der Wärme unter Bindung des Phenols zerlegt (Baumann)<sup>3)</sup>; einer in der Kälte mit kohlensaurem Alkali übersättigten Phenollösung lässt sich demnach das Phenol durch Äther entziehen, einer mit Alkalihydrat übersättigten dagegen nicht.

Durch Lösen von Bleioxyd in Phenol entsteht das Bleiphenolat  $C_6H_5O \cdot PbO$ , beim Füllen von Phenol mit Bleiessig die Verbindung  $4C_6H_5O, 3PbO$  (s. Bestimmung des Phenols 1. b.)

3. Eine heissgesättigte Lösung von Pikrinsäure in 50%igem Alkohol gibt mit einer Lösung von Phenol in ebenso starkem Alkohol eine krystallinische Verbindung von  $C_6H_5 \cdot OH, 2C_6H_2(NO_2)_3 \cdot OH$  (Goedike)<sup>4)</sup>.

4. Das Phenol gibt eine Reihe von Reaktionen, von welchen die meisten für den Nachweis desselben gut verwendbar sind.

a) Salpetersaures Silber wird beim Kochen mit Phenol, auch bei Gegenwart von überschüssigem Ammoniak, nicht verändert; nach Zusatz von Kali- oder Natronlauge gibt jedoch die heisse Flüssigkeit einen schwarzen Niederschlag von metallischem Silber. — Salpetersaures Quecksilberoxyd wird durch Phenol nicht reduziert, ebensowenig Fehlingsche Flüssigkeit.

b) Phenollösungen werden auf Zusatz neutraler Eisenchloridlösungen intensiv blauviolett gefärbt.

Die Färbung wird durch viel überschüssiges Reagens, sowie schon durch Spuren von Säuren oder Ammoniak aufgehoben oder verhindert. Eine alkoholische oder mit Hilfe von Alkohol bereitete Phenollösung gibt die Reaktion nicht (Hesse), aber mässige Mengen Alkohol bringen die entstandene Blaufärbung nicht zum Verschwinden (Huppert). Salicylsäure gibt dieselbe Reaktion; eine mit Eisen-

<sup>1)</sup> C. Lewin, Hofmeisters Beiträge 1. 742. 1902. — P. Mayer, ebenda 2. 217. 1903. — H. Scholz, Ztschr. f. physiol. Ch. 38. 513. 1903.

<sup>2)</sup> W. Jacobson, Beitrag zum Nachweis des Phenols im Tierkörper. Diss Dorpat 1885; Ztschr. f. analyt. Ch. 25. 607. 1886.

<sup>3)</sup> Baumann, Ber. d. chem. Gesellsch. 10. 686. 1877.

<sup>4)</sup> R. Goedike, Arch. des sciences biol. 2. 422. 1893.

chlorid violett gefärbte Salicylsäurelösung zeigt aber nach Krukenberg<sup>1)</sup> einen Absorptionsstreifen zwischen E und F, während eine ebensolche Phenollösung nur bei starker Konzentration und bei hellster Beleuchtung einen schwachen Streifen auf D erkennen lässt.

Weniger empfindlich gegen Säure ist die Blaufärbung, welche Phenolsulfosäure mit Eisenchlorid gibt (Raschig<sup>2)</sup>).

c) Wird Phenolalkali in der Wärme mit Chloroform befeuchtet, so bildet sich sogleich ein roter, in verdünntem Alkohol mit carminroter Farbe löslicher Beschlag; die Reaktion wird noch mit Spuren von Phenol erhalten (Guareschi<sup>3)</sup>).

Resorcin gibt nach Lustgarten dieselbe Reaktion, Brenzkatechin und Hydrochinon dagegen nicht. — Nach Desesquelles färbt Resorcin rosa, Hydrochinon goldgelb, Kresot violett, Thymol dunkelviolet,  $\alpha$ -Naphthol himmelblau,  $\beta$ -Naphthol grünblau, Pyrogallol violett. Nach Lambert<sup>4)</sup> geben mit Jodoform Resorcin, Phloroglucin, Pyrogallol rosa oder rot, Orcin und Salicylsäure rotviolett, Guajacol und Thymol violett, Hydrochinon und die beiden Naphthole blau; das Jodoform lässt sich durch Chloroform oder Bromoform ersetzen. Die Färbungen verschwinden nach Zusatz von Säure, treten aber bei Zusatz von Alkali wieder auf.

d) Wird 1 cem so schwache wässrige Phenollösung, dass sie sich kaum noch mit Eisenchlorid färbt, mit einigen Körnchen Paraoxybenzaldehyd (oder Salicylaldehyd) und dem gleichen Volumen konzentrierter Schwefelsäure versetzt, so erwärmt sie sich unter Bildung von Aurin; die gelbe Lösung wird beim Übersättigen mit Alkali schön rosa. Die Probe ist nicht so empfindlich wie die mit Brom (l.) (Nencki und Sieber)<sup>5)</sup>.

e) Löst man ein Körnchen Phenol in 1 cem Wasser, fügt 1 Tropfen 0,5%iges Furfurolwasser hinzu und lässt unter die Mischung 1 cem konzentrierte Schwefelsäure fließen, so färbt sich die Flüssigkeit kirschrot, später blau. Man hat durch Abkühlen dafür zu sorgen, dass die Temperatur der Mischung nicht über 50° steigt (v. Udránszky)<sup>6)</sup>.

f) Mit Diazobenzolsulfonsäure färbt sich eine stark alkalische Phenollösung dunkelrot (Penzoldt und Fischer)<sup>7)</sup>.

In alkalischer Lösung gibt Phenol und p-Diazonitranilin einen roten, in Wasser löslichen Diazokörper (Riegler)<sup>8)</sup>:



Auf tropfenweisen Zusatz von verdünnter Schwefelsäure bis zur stark sauren Reaktion und tüchtiges Rühren scheidet sich ein gelber Körper  $\text{C}_6\text{H}_4 \cdot \text{NO}_2 \cdot \text{N} : \text{N} \cdot \text{C}_6\text{H}_4 \cdot \text{OH}$  aus, der in Wasser fast unlöslich ist und zur quantitativen Abscheidung dienen kann.

Zur Bereitung des p-Diazonitranilins bringt man in ein 200 cem-Fläschchen 5 g p-Nitranilin, 25 cem Wasser und 6 cem reine konzentrierte Schwefelsäure,

<sup>1)</sup> O. Hesse, Ann. d. Chem. 182. 161. 1876. — Krukenberg, Verhandl. d. physik. med. Gesellsch. zu Würzburg, N. F. 18. 197. 1884.

<sup>2)</sup> F. Raschig, Ztschr. f. angew. Chem. 20. 2066. 1907.

<sup>3)</sup> Guareschi, Ber. d. chem. Gesellsch. 5. 1055. 1872.

<sup>4)</sup> S. Lustgarten, Monatshefte f. Chemie 3. 719. 1882. — E. Desesquelles, Comptes rendus de la Soc. de Biol. 1890. 101; Jahresber. f. Tierchem. 20. 180. — L. M. Lambert, L'Union pharmaceutique 33. 17; Ztschr. f. analyt. Ch. 32. 235.

<sup>5)</sup> Nencki u. Sieber, Journ. f. prakt. Chem. [2] 26. 25. 1882.

<sup>6)</sup> L. v. Udránszky, Ztschr. f. physiol. Ch. 12. 355. 1888.

<sup>7)</sup> F. Penzoldt u. E. Fischer, Berichte d. chem. Gesellsch. 16. 657. 1883.

<sup>8)</sup> Riegler, Chem. Centralbl. 1899. II. 322.



schüttelt, fügt 100 ccm Wasser und sofort 3 g Natriumnitrit, in 25 ccm Wasser gelöst, zu und füllt zu 500 ccm auf. Das Reagens wird filtriert und im Dunkeln aufgehoben.

g) Erwärmt man Phenollösung mit etwas gewöhnlicher (untersalpetersäurehaltiger) Salpetersäure, so färbt sich die Flüssigkeit unter Bildung von Pikrinsäure intensiv gelb, darauf beim Übersättigen mit Natronlauge braungelb. — Kreosot (Kreosol und Guajacol) verhält sich nach Saillet<sup>1)</sup> ebenso.

h) Fügt man nach Allen<sup>2)</sup> zu einigen Tropfen Salzsäure 1—2 Tropfen der zu untersuchenden Flüssigkeit und dann einen Tropfen konzentrierter Salpetersäure, so färbt sich die Flüssigkeit alsbald kirschrot; gelindes Erwärmen unterstützt den Eintritt der Reaktion, Alkohol verhindert sie nicht. — Beim Übersättigen mit Natronlauge färbt sich die rote Flüssigkeit dunkelbraun.

Nach Cotton<sup>3)</sup> geht bei der Destillation eines normalen Harns mit  $\frac{1}{20}$  seines Gewichts Salpetersäure ein Körper über, der sich beim Abkühlen als eine gelbe, in Äther lösliche Substanz ausscheidet, Phenol-Eigenschaften hat und mit Alkalien ein rotes krystallinisches Salz bildet.

i) Mischt man Phenollösung mit einigen Tropfen einer alkoholischen Lösung von Salpetrigsäure-Äthylester und dem gleichen Volumen konzentrierter Schwefelsäure, so tritt Rotfärbung ein. Schichtet man die Mischung auf die Schwefelsäure, so bildet sich ein roter Saum. Die Reaktion tritt noch bei 1:2000000 ein. Der Salpetrigsäure-Äther lässt sich nicht durch salpetrigsaures Kali ersetzen, wohl aber durch dieses und Alkohol, doch tritt, wenn die salpetrige Säure im Überschuss ist, leicht gelbliche Färbung ein (Eijkman)<sup>4)</sup>.

k) Setzt man nach E. W. Davy<sup>5)</sup> in einer Porzellanschale 3—4 Tropfen Molybdänschwefelsäure (eine Lösung von 1 Teil Molybdänsäure in 10 oder mehr Teilen konzentrierter Schwefelsäure) zu 1—2 Tropfen Phenollösung, so tritt sogleich eine hellgelbe bis gelblichbraune Färbung ein, die durch eine kastanien- oder rotbraune in eine schön purpurfarbene übergeht; durch sehr gelindes Erwärmen wird die Reaktion beschleunigt. — In sehr verdünnten Phenollösungen entsteht erst eine dunkelolivengrüne, schnell blau werdende, aber keine purpurrote Färbung.

l) Versetzt man Phenollösung mit Bromwasser bis zu einer dauernden, leichten Gelbfärbung, so tritt nach Landolt<sup>6)</sup> ein gelblichweisser, flockiger, krystallinischer Niederschlag von Tribromphenol  $C_6H_2Br_3 \cdot OH$  auf. Bei einer Verdünnung von 1:40 000 entsteht sofort noch Trübung, bei einer Verdünnung von 1:50 000 nach einigen Stunden ein krystallinischer Niederschlag.

Nach Benedikt besteht der Niederschlag bei Verwendung eines starken Überschusses von Bromwasser aus Tribromphenol-Brom  $C_6H_2Br_3 \cdot OBr$ ; derselbe krystallisiert aus Bromwasser in

<sup>1)</sup> Saillet, Bull. gén. de therap. 8. 1892; Jahresb. f. Tierch. 1893. 254.

<sup>2)</sup> Allen, Chem. Centralbl. 1879. 559.

<sup>3)</sup> S. Cotton, Journ. Pharm. Chim. [6] 10. 59. 1901. zit. n. Jahrb. f. Tierch. 31. 442.

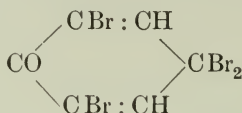
<sup>4)</sup> J. F. Eijkman, Ztschr. f. anal. Ch. 22. 576. 1883.

<sup>5)</sup> E. W. Davy, Ztschr. f. anal. Ch. 18. 292. 1879.

<sup>6)</sup> H. Landolt, Ber. d. chem. Gesellsch. 4. 770. 1871.



citronengelben, glänzenden Plättchen, die bei  $131^0$ , bisweilen auch  $133$  bis  $135^0$ , unter Zersetzung schmelzen (Autenrieth und Beuttel), und zersetzt sich beim Kochen mit Alkohol zu Tribromphenol. Die Wägung des Niederschlags von Tribromphenolbrom kann zur quantitativen Bestimmung reiner Phenollösungen dienen (Autenrieth und Beuttel). Nach Thiele und Eichwede ist das Tribromphenolbrom ein substituiertes Chinon von der Formel



Durch Natriumamalgam lässt sich das Phenol aus dem Tribromphenol regenerieren. — Das Tribromphenol löst sich nach Rumpf<sup>1)</sup> in (10%iger) Sodalösung, das Tribromphenolbrom, wie es scheint, nicht. Neben diesen Verbindungen entstehen ausserdem braune Produkte.

Die Probe lässt sich nach Jacobson<sup>2)</sup> noch mit 1 Tropfen Phenollösung (mit 1 g Phenol in 40000) ausführen, wenn man die Flüssigkeit auf dem Objektträger Bromdämpfen aussetzt. Das Mikroskop weist die Krystalle nach.

Ausser dem Phenol geben noch manche andere Substanzen, die entweder im Harn vorkommen können oder zu Harnbestandteilen in Beziehung stehen, mit Bromwasser, wenn auch nicht immer krystallinische, Niederschläge, so das Kresol und die Paraoxybenzoesäure (beide Tribromphenol liefernd), die Salicylsäure (Dibromsalicylsäure), das Indol und Indican, die Kynurensäure, die Oxyssäuren des Harns. — Im Harndestillat wird der Niederschlag nicht immer krystallinisch. Im Destillat von Hundeharn entsteht nach I. Munk mit Bromwasser nur selten ein Niederschlag. Häufiger aber, wenn man den Harn vor der Destillation alkalisch macht und eindampft.

m) Das Phenol gibt, wie nach O. Nasse alle Monohydroxyl-Benzolderivate, die Millonsche Reaktion. Dieselbe kann in verschiedenen Modifikationen angestellt werden. Die bei der Millonschen Reaktion entstehenden roten Verbindungen sind nach Dimroth<sup>3)</sup> wahrscheinlich metallorganische Oxyphenyl-Quecksilberverbindungen.

a) Man setzt vom Millonschen Reagens 5—10 Tropfen zu einer Phenollösung, kocht und tropft zu der heissen Flüssigkeit so viel Salpetersäure, bis der beim Kochen entstandene Niederschlag wieder verschwunden ist; die Flüssigkeit nimmt dabei eine schön rote Färbung an. Die Reaktion misslingt niemals, nur muss man einen grossen Überschuss von Salpetersäure vermeiden. Die Färbung ist sehr intensiv und hält sich mehrere Tage (Almén<sup>4)</sup>).

Zur Bereitung des Millonschen Reagens löst man nach Millon<sup>5)</sup> Quecksilber in dem gleichen Gewicht 63%iger Salpetersäure ( $4 \text{ HNO}_3 + 3 \text{ H}_2\text{O}$ ) erst in der Kälte, dann unter gelindem Erwärmen, verdünnt 1 Vol. der Lösung mit 2 Vol.

<sup>1)</sup> R. Benedikt, Ber. d. chem. Gesellsch. **12**. 1005. 1880; Ann. d. Ch. **199**. 127. — W. Autenrieth u. F. Beuttel, Arch. der Pharmacie **248**. 112. zit. n. Chem. Zentr. 1910. I. 1646. — J. Thiele und H. Eichwede, Ber. d. chem. Ges. **33**. 673. 1900. — Rumpf, Ztschr. f. physiol. Ch. **16**. 239. 1892.

<sup>2)</sup> Jacobson, Ztschr. f. analyt. Ch. **25**. 607. 1886.

<sup>3)</sup> Dimroth, Ber. d. chem. Ges. **35**. 2856. 1902.

<sup>4)</sup> Aug. Almén, Ztschr. f. anal. Chem. **17**. 107. 1878.

<sup>5)</sup> Millon, Comptes rendus **28**. 40. 1889.

Wasser und lässt den entstandenen Niederschlag sich absetzen. Die klare Lösung ist das Reagens.

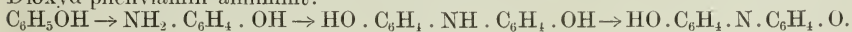
β) Kocht man eine verdünnte Phenollösung mit einem Überschuss von salpetersaurem Quecksilberoxyd, so bleibt die Flüssigkeit entweder unverändert, oder es entsteht bei genügender Konzentration der Lösung ein weisser sandiger Niederschlag; fügt man darauf eine Lösung von salpetrigsaurem Kali hinzu, so färben sich Flüssigkeit und Niederschlag schön dunkelrot. Dieselbe Reaktion tritt ein, wenn man der Flüssigkeit schon vor dem Kochen das salpetrigsaure Kali zusetzt. Nach Armsby <sup>1)</sup> erfolgt die Reaktion auch in der Kälte nach einiger Zeit.

γ) Erhitzt man eine Phenollösung mit einer Lösung von salpetersaurem Quecksilberoxyd, die eine Spur salpetriger Säure enthält, zum Kochen, so färbt sich die Flüssigkeit intensiv rot, bei konzentrierteren Lösungen unter Abscheidung von metallischem Quecksilber. Die Reaktion ist noch bei einer Verdünnung von 1:60000 sehr deutlich (Plugge) <sup>2)</sup>.

η) Eine ammoniakalische Phenollösung färbt sich auf Zusatz eines unterchlorigsauren Salzes wie das Anilin schön blau (Berthelot) <sup>3)</sup>.

Die Reaktion gelingt nicht leicht. Man darf nur so viel unterchlorigsaures Salz (Lösung von 1 Teil Chlorkalk in 20 Teilen Wasser) hinzufügen, dass nicht alles Ammoniak zersetzt wird. Die Flüssigkeit ist anfangs grün, wird aber dann schnell blau; gelindes Erwärmen beschleunigt die Reaktion. Beim Ansäuern wird die Flüssigkeit rot, bei darauf folgendem Übersättigen mit Ammoniak wieder blau. — Brom gibt nach Cotton <sup>4)</sup> diese Reaktion noch besser, als unterchlorigsaures Salz. Zweckmässig fügt man zur wässerigen, schwach ammoniakalisch gemachten, zum Sieden erhitzten Lösung frisches Bromwasser.

Der entstehende blaue Farbstoff wird als Indophenol bezeichnet. Raschig <sup>5)</sup> erklärt die Reaktion, indem er die intermediäre Bildung von Monochloramin bzw. Monobromamin und als Zwischenprodukte p-Aminophenol und Dioxylphenylamin annimmt:



ο) Versetzt man nach E. Jacquemin <sup>6)</sup> eine Phenollösung mit (der gleichen Menge) Anilin und darauf mit unterchlorigsaurem Natron, so entsteht erythrocarbolsaures Natron, welches eine blaue Farbe besitzt. Säuren färben die Flüssigkeit rot, Alkalien wieder blau.

Behandelt man Anilin mit Chlorwasser oder unterchlorigsaurem Salz und versetzt man das Filtrat mit überschüssigem Ammoniak, so erhält man nach Cotton eine braune Flüssigkeit, welche auf Zusatz von Phenol blau wird. — Jacobson <sup>7)</sup> führt die Probe in folgender Weise aus. Es werden 3 Tropfen farbloses Anilin in 50ccm Wasser gelöst und davon 5—10 Tropfen in einem halben Reagenzglas Wasser mit einer Natriumhypochloritlösung vermischt, welche man durch Verreiben gleicher Teile Chlorkalk und kohlensauren Natrons mit etwas Wasser und Filtrieren erhält. Von dieser Mischung setzt man so lang zu der ammoniakalischen Probe hinzu, bis sie deutlich violett oder braungelb geworden ist. Bei Gegenwart von Phenol geht die Färbung in grün oder blau über.

<sup>1)</sup> H. P. Armsby, Landwirtsch. Versuchsstationen 25. 471. 1880.

<sup>2)</sup> P. C. Plugge, Ztschr. f. analyt. Chem. 11. 173. 1872.

<sup>3)</sup> Berthelot, Chem. Centralbl. 1859. 463.

<sup>4)</sup> Cotton, Bull. de la Soc. chim. [2] 21. 8. 1874.

<sup>5)</sup> F. Raschig; Ztschr. f. angew. Chem. 20. 2069. 1907.

<sup>6)</sup> E. Jacquemin, Comptes rendus 76. 1605; Ztschr. f. anal. Ch. 15. 367. 1876.

<sup>7)</sup> Jacobson, a. a. O.

Die Reaktion tritt nach Denigès<sup>1)</sup> noch ein, wenn man eine Lösung von 40 g Phenol und 5 g Anilin in 1 Ltr. mit einer Spur Hypochlorit versetzt; sie ist nach Jacquemin viel empfindlicher als b, tritt aber nach Almén nicht immer ein.

Mehrere dieser Reaktionen sind nach ihrer Schärfe untereinander verglichen worden. Nach Almén ist die empfindlichste die mit Millons Reagens (m) in Modifikation  $\alpha$ , sie zeigt das Phenol noch in zweimillionenfacher Verdünnung an; minder empfindlich ist die Modifikation  $\beta$ , sie lässt das Phenol noch bei einer Verdünnung von 1:200000 erkennen. Auf diese folgt die Reaktion mit Bromwasser (l, 1:60000), die mit unterchlorigsaurem Natron (n und o, 1:50000), die Reaktion von Plugge (m  $\gamma$ , 1:15000) und die Eisenreaktion (b, 1:3000).

Eine ähnliche Vergleichung stellte E. Pollucci<sup>2)</sup> an. Er erhielt die Landoltsche Reaktion (l) noch bei einer Verdünnung von 1:15000, die Gelbfärbung mit Salpetersäure (g) noch bei 1:6000, die mit Chlorkalk und Ammoniak (n) bei 1:3000, die mit Eisenchlorid (b) bei 1:2000.

p) Phenol gibt nach Messinger und Vortmann<sup>3)</sup> beim Erwärmen mit Jod und Natronlauge auf 50–60° einen dunkelroten, amorphen Niederschlag von Trijodphenol.

Die Reaktion geht auch in der Kälte vor sich, vollzieht sich aber dann nur sehr langsam. Zur vollständigen Überführung des Phenols in Trijodphenol ist ein ziemlich grosser Überschuss an Jod erforderlich (Kossler und Penny<sup>4)</sup>). Durch Thiosulfat wird das Trijodphenol nicht zerlegt.

5. Erhitzt man Phenol mit der vierfachen Menge Pyridin und der molekularen Gewichtsmenge Diphenylharnstoffchlorid im Kölbchen mit Steigerrohr eine Stunde lang in siedendem Wasser und giesst die Lösung unter Umrühren in Wasser, so scheidet sich ein rötlicher, mehr oder weniger verschmierter Krystallbrei aus, der sich nach Abgiessen des Wassers und oberflächlichem Trocknen aus Ligoïn umkrystallisieren lässt. Er besteht aus Phenol-diphenylurethan; die Krystalle erweichen bei 102° und schmelzen zwischen 104–105°.

$\text{C}_6\text{H}_5\cdot\text{OH} + \text{Cl}\cdot\text{OC}\cdot\text{N}(\text{C}_6\text{H}_5)_2 = \text{C}_6\text{H}_5\text{—O}\cdot\text{CO}\cdot\text{N}(\text{C}_6\text{H}_5)_2 + \text{HCl}$  (J. Herzog<sup>5)</sup>).

6. Phenol (1,1 g) mit  $\alpha$ -Naphthylisocyanat (1,7 g) in trockenem Glase gelinde erwärmt, gibt nach 12 stündigem Stehen lange Spiesse von Phenyl- $\alpha$ -naphthylurethan  $\text{C}_{10}\text{H}_7\cdot\text{NH}\cdot\text{CO}\cdot\text{OC}_6\text{H}_5$ . Man löst in viel kochendem Ligoïn und filtriert vom Dinaphthylharnstoff ab; aus dem Ligoïn krystallisiert das Urethan, das bei 133° erweicht, bei 136–137° schmilzt (Neuberg und Hirschberg<sup>6)</sup>).

7. Mit salpetriger Säure entwickelt das Phenol nach Kreusler eine nicht unerhebliche Menge Stickstoff. — Eine alkalische Permanganatlösung wird nach Baeyer<sup>7)</sup> durch Phenol augenblicklich reduziert.

8. Physiologisches Verhalten: Von verabreichtem Phenol verschwinden beim Hunde, je nach der Grösse der Gabe, 42–70%

<sup>1)</sup> Denigès, Bull. de la Soc. chim. [3] 5. 66.

<sup>2)</sup> E. Polluci, Ber. d. chem. Gesellsch. 9. 360. 1874.

<sup>3)</sup> J. Messinger u. G. Vortmann, Ber. d. chem. Gesellsch. 22. 2313. 1889.

<sup>4)</sup> A. Kossler u. E. Penny, Ztschr. f. physiol. Ch. 17. 122. 1892.

<sup>5)</sup> J. Herzog, Ber. d. chem. Gesellsch. 40. 1831. 1907.

<sup>6)</sup> C. Neuberg u. E. Hirschberg, Biochem. Ztschr. 27. 341. 1910.

<sup>7)</sup> U. Kreusler, Landwirtschaftl. Versuchsstationen 31. 309. 1885. — Baeyer, Ann. d. Ch. 246. 149.



nach Auerbach,  $\frac{1}{2}$ — $\frac{3}{4}$  nach Marfori, beim Pferd 41—54% (J. Munk)<sup>1)</sup>.

C. Nachweis. Direkt im Harn lässt sich das Phenol mit keiner der Phenolreaktionen nachweisen, trotz ihrer grossen Empfindlichkeit; es ist vielmehr das Phenol im Harn erst aus den gepaarten Verbindungen abzuscheiden und dann abzudestillieren.

Zu diesen Zwecke wird Harn (1 l) mit soviel Schwefelsäure versetzt, dass er 5%  $\text{H}_2\text{SO}_4$  enthält und so lange destilliert, bis sich das Destillat mit Bromwasser nicht mehr trübt, oder sich bei der Millonschen Reaktion nicht mehr rosenrot färbt, wobei allerdings nach Kossler und Penny nicht alles Phenol gewonnen wird. Mit dem Destillat lassen sich ohne weiteres Reaktionen anstellen. Um das gewonnene Phenol (Kresol) in konzentriertere Lösung zu bringen und zugleich etwa vorhandene Salicylsäure, welche die Reaktionen beeinträchtigen würde, zu entfernen, sättigt man das Destillat in der Kälte mit kohlensaurem Natron und schüttelt es wiederholt mit Äther aus. Die abgehobenen Ätherportionen vereinigt man und lässt sie bei gewöhnlicher Temperatur verdunsten. Baumann<sup>2)</sup> reinigt das Phenol in der Weise, dass er das Destillat mit Äther ausschüttelt, den Äther abdestilliert, den Rückstand mit überschüssiger Kalilauge kocht, um flüchtige, stickstoffhaltige Substanzen zu entfernen, die Flüssigkeit ansäuert, wieder mit Äther ausschüttelt und den Äther verdunstet.

Nach Vergiftung mit sehr grossen Gaben Phenol ist ein Teil desselben auch als solches und als Phenolalkali im Harn enthalten und kann schon durch Destillieren des Harns mit Essigsäure gewonnen werden (Reale). — Um die Ausbeute an Phenol zu erhöhen, empfiehlt es sich, nach Munk, den Harn vor der Destillation bei alkalischer Reaktion auf  $\frac{1}{5}$  einzudampfen. — Die unterjodige Säure (B. 4. p.) ist kein geeignetes Reagens, weil es mit Aceton, welches im Destillat, namentlich reichlich bei Gegenwart von Acetessigsäure, enthalten sein kann, einen (gelben) Niederschlag von Jodoform gibt; ein ähnlicher Niederschlag entsteht nach Salkowski und Taniguti<sup>3)</sup> auch mit einer aldehydartigen Substanz, welche im Destillat auftritt, wenn man den Harn mit Schwefelsäure zu weit einkocht.

Einige der Phenolreaktionen fallen mit denen des Kresols zusammen, so das Verhalten gegen Brom und gegen Salpetersäure; wie weit die Ähnlichkeit reicht, ist nicht für alle Reaktionen bekannt. Unzweifelhaft ist es aber, dass das Kresol vielfach mit dem Phenol verwechselt worden ist. Eine Trennung des Phenols vom Kresol ist von Brieger<sup>4)</sup> durch fraktionierte Destillation vieler hundert Liter Menschenharn und von Baumann durch Überführen der Phenole in ihre Sulfonsäuren bewerkstelligt worden (vgl. Kresol, Nachweis).

#### D. Bestimmung s. S. 784 ff.

<sup>1)</sup> A. Auerbach, Virchows Arch. 77. 226. 1879. — P. Marfori, Arch. di Farmac. e Terap. 2. 1894. zit. n. Jahresber. f. Tierch. 24. 98. — I. Munk, Du Bois' Arch. 1881. 460.

<sup>2)</sup> Kossler u. Penny, a. a. O. 135. — Baumann, Ztschr. f. physiol. Ch. 6. 186. 1882.

<sup>3)</sup> E. Reale, Gaz. delle cliniche 1890; Zentralbl. f. klin. Med. 12. 487; Jahresb. f. Tierch. 1891. 401. — I. Munk, Du Bois Archiv 1880. Suppl. 27. — E. Salkowski u. Ken Taniguti, Ztschr. f. physiol. Ch. 14. 476. 1890. — Salkowski, Pflügers Archiv 56. 339. 1894.

<sup>4)</sup> Brieger, Ztschr. f. physiol. Chem. 4. 206. 1870.

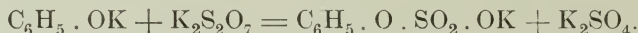


## Anhang.

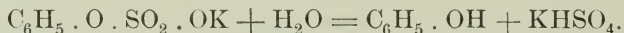
## 1. Phenolschwefelsäure.



Wird gepulvertes, pyroschwefelsaures Kalium mit überschüssigem Phenolkalium in konzentrierter, wässriger Lösung längere Zeit auf 60—70° erhalten, so bildet sich nach Baumann<sup>1)</sup> phenolschwefelsaures Kali:



Das Salz bildet farblose, glänzende, sich fettig anfühlende Plättchen, löst sich leicht in Wasser, sehr schwer in kaltem, leichter in heissem Alkohol. Im Gegensatz zu dem ihm isomeren phenolsulfonsauren Kali färbt es sich mit Eisenchlorid nicht. Beim Aufbewahren an feuchter Luft zersetzt sich das Salz sehr langsam, beim Erhitzen mit Wasser über 100° in einigen Stunden in Phenol und saures schwefelsaures Kali:



Dieselbe Zersetzung erleidet es, wenn eine wässrige Lösung desselben in der Kälte mit einer starken Mineralsäure vermischt wird; beim Erwärmen mit verdünnter Salzsäure (selbst 0,1%ige, Szabó<sup>2)</sup>) wird es schon in wenig Minuten vollkommen zerlegt. Verdünnte Essigsäure bewirkt diese Zersetzung erst bei längerem Kochen allmählich; das im Harn enthaltene phenolschwefelsaure Salz wird durch einstündiges Erwärmen mit verdünnter Essigsäure nicht zersetzt. Auch durch Kochen mit saurem schwefelsaurem Kali wird es zersetzt. Dagegen widersteht es der Einwirkung der Fäulnis und der der Alkalilaugen; es kann selbst mit konzentrierter Kalilauge ohne Zersetzung gekocht werden.

Das lufttrockene Salz beginnt sich schon unter 100° zu zersetzen; bei 150—160° verwandelt es sich vollständig in das isomere paraphenolsulfonsaure Kali:  $\text{HO} \cdot \text{C}_6\text{H}_4 \cdot \text{SO}_2 \cdot \text{OK}$ .

Im Gegensatz zum Kalisalz ist das Natronsalz leicht zersetzlich; es zersetzt sich schon beim Verdampfen seiner wässrigen Lösung auf dem Wasserbad. In trockenem Zustand nimmt es begierig Feuchtigkeit auf und lässt sich nur kurze Zeit unzersetzt aufbewahren. Bei ungefähr 130° geht das trockene Salz in paraphenolsulfonsaures über.

Mit Barytsalzen gibt die Phenolschwefelsäure bzw. ihre Salze keine Fällung.

Die Phenolschwefelsäure ist von Baumann als Kalisalz aus dem Pferdeharn dargestellt worden<sup>3)</sup>; doch lässt sie sich hier nur

<sup>1)</sup> Baumann, Ztschr. f. physiol. Ch. **6**. 186. 1882.

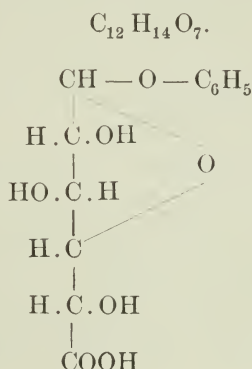
<sup>2)</sup> D. Szabó, Ztschr. f. physiol. Ch. **1**. 140. 1877.

<sup>3)</sup> Baumann, Pflügers Archiv **13**. 289; Ztschr. f. physiol. Chem. **2**. 335. 1879.

schwer frei von Kresolschwefelsäure gewinnen; rein erhält man sie dagegen aus dem Harn von Menschen oder Hunden, welche mit Phenol behandelt wurden.

Man verdunstet nach Baumann<sup>1)</sup> 8—10 l Harn von Hunden, denen täglich mehrere Gramm Phenol beigebracht wurden, zum Syrup, extrahiert den Rückstand mit 96%igem Alkohol, fällt die abfiltrierte Lösung in der Kälte mit einer Lösung von Oxalsäure in Alkohol vollständig aus, filtriert sogleich und setzt Kalihydrat bis zur schwach alkalischen Reaktion zu. Es wird alsdann wieder filtriert, die Flüssigkeit zum Syrup verdunstet und dieser in der Kälte stehen gelassen oder der Einwirkung einer Kältemischung ausgesetzt, wobei er zu einem Brei von Krystallplättchen erstarrt. Diese werden auf dem Vacuumfilter von der Mutterlauge befreit und aus siedendem Alkohol umkrystallisiert.

## 2. Phenolglycuronsäure.

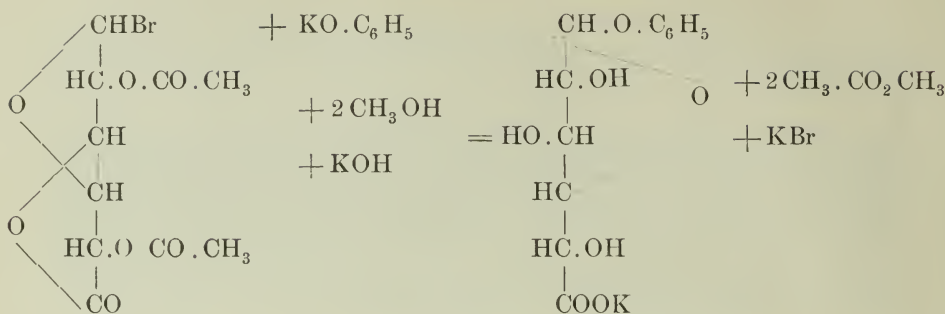


Phenolglycuronsäure ist von Neuberg und Neimann<sup>2)</sup> synthetisch dargestellt worden:

16 g Acetobromglycuronsäurelacton, das aus krystallisiertem Glycuronsäurelacton und Acetyl bromid erhalten wird, und 3,18 g Phenol werden in 150 ccm Methylalkohol gelöst und mit einer Lösung von 1,5 g Kalium in 20 ccm Methylalkohol versetzt. Die Flüssigkeit färbt sich bald gelb und scheidet Bromkalium ab; Geruch nach Essigester tritt auf. Nach 3 Wochen filtriert man die bis dahin verschlossen und im Dunkeln aufbewahrte Lösung und verdunstet sie bei gewöhnlicher Temperatur. Den sirupösen Rückstand löst man in wenig Wasser, leitet zur Zersetzung von noch vorhandenem Phenolkalium Kohlensäure ein und extrahiert das Phenol mit Petroläther. Die vom Phenol befreite Lösung dampft man ein, versetzt mit sehr verdünnter (höchstens 5%iger) Schwefelsäure bis zur deutlich sauren Reaktion und extrahiert mit einem Gemisch von 2 Vol. Äther und 1 Vol. Alkohol 5—6 mal. Die Auszüge werden bei höchstens 40° zu einem Sirup verdunstet, der innerhalb 48 Stunden zu einem Krystallbrei erstarrt. Dieser wird nach dem Abpressen auf Ton durch Krystallisation aus heissem Wasser unter Zusatz von Knochenkohle rein erhalten.

<sup>1)</sup> Baumann, Pflügers Archiv 13. 294; Ztschr. f. physiol. Chem. 2. 336.

<sup>2)</sup> C. Neuberg u. W. Neimann, Ztschr. f. physiol. Chem. 44. 114. 1905.



A. Vorkommen. Die Anwesenheit von Phenolglycuronsäure im normalen Menschenharn ist durch Neuberg und P. Mayer wahrscheinlich gemacht worden. Aus dem Harn eines mit Cocain vergifteten Menschen isolierte Wohlgemuth das Brucinsalz einer Säure, dessen Analyse auf phenol- oder kresolglycuronsaures Brucin stimmte. Külz<sup>1)</sup> hat die Säure aus dem Harn von Kaninchen, die Phenol zum Futter erhalten hatten, rein dargestellt.

Die Identität der synthetischen Verbindung und der im Harn vorkommenden haben Salkowski und Neuberg<sup>2)</sup> festgestellt.

B. Eigenschaften. Die Säure löst sich leicht in heissem Alkohol und heissem Essigäther, weniger in Äther, nicht in Ligroin. Beim längeren Stehen im Tageslichte färbt sich die feste Substanz wie die wässrige Lösung schwach rosa. Sie krystallisiert in farblosen, undurchsichtigen, langen Nadeln vom Schmelzpunkte 150—151° (148°, Külz);  $[\alpha]_D^{17} = -83,3^\circ$ .

Die Salze sind sämtlich wasserlöslich bis auf die Bleiverbindung, die durch Bleiessig aus der freien Säure wie aus deren Salzen gefällt wird. Auch Alkaloidsalze, wie das Brucinsalz, sind relativ schwer löslich, besitzen gutes Krystallisationsvermögen und eignen sich deshalb zur Isolierung.

Durch Kochen mit Säuren wird die Verbindung in Phenol und Glycuronsäure gespalten, sie reduziert alkalische Kupferlösung erst nach der Spaltung. Kefirlactase und Emulsin, nicht aber Hefemaltase hydrolysieren die Verbindung langsam und partiell.

C. Darstellung. Am bequemsten erhält man die Säure nach Salkowski und Neuberg aus Hammelharn, nach Fütterung von

<sup>1)</sup> C. Neuberg u. P. Mayer, Ztschr. f. physiol. Chem. **29**, 256. 1900. — J. Wohlgemuth, Berliner klin. Wochenschr. 1904. 1084. — E. Külz, Ztschr. f. Biologie **27**, 248, 1890.

<sup>2)</sup> E. Salkowski u. C. Neuberg, Biochem. Ztschr. **2**, 307. 1906/7.

5 g Phenol täglich. Portionen von 10 Liter Harn wurden mit gepulvertem normalem Bleiacetat so lange geschüttelt, bis alle dadurch fällbaren Verbindungen niedergeschlagen waren. Das wasserklare Filtrat wurde mit Bleiessig ausgefällt, der Niederschlag nach gründlichem Waschen unter sorgfältigem Verreiben mit Schwefelammonium in gelinder Wärme zersetzt. Das Filtrat vom Bleisulfid wurde auf dem Wasserbade eingedampft und verwandelte sich nach einigen Tagen in einen Krystallbrei. Dieser wurde mit dem dreifachen Volum Wasser übergossen, gründlich durchgerührt und vom Schwerlöslichen (Benzoessäure und Hippurssäure) abgesaugt. Das Filtrat wurde zur eben beginnenden Krystallisation eingeengt und mit kalt gesättigter Bleizuckerlösung versetzt. Vom Niederschlag wurde filtriert, das Filtrat mit Bleiessig gefällt. Das Bleisalz wurde abfiltriert, ausgewaschen, mit Schwefelwasserstoff zersetzt. Aus dem Filtrat vom Schwefelblei krystallisierte beim Einengen die Säure, die nach einmaligem Umkrystallisieren aus heissem Wasser rein war.

Wohlgemuth<sup>1)</sup> fällte den Harn sukzessive mit Bleiacetat, Bleiessig und Bleiessig mit Ammoniak; die beiden letzten Fällungen enthielten, wie die Orcinreaktion des zersetzten Bleiniederschlags zeigte, gepaarte Glycuronsäure. Der Bleiessigniederschlag wurde mit Schwefelwasserstoff zersetzt, vom Schwefelblei filtriert, das Filtrat zum dünnen Sirup im Vacuum eingeengt. Die Lösung wurde mit Brucin behandelt, das überschüssige Brucin mit Äther ausgeschüttelt und die Lösung eingeengt. Da das auskrystallisierte weisse Salz noch mit Phosphaten und Sulfaten verunreinigt war, wurde es mit Barythydrat zersetzt und der überschüssige Baryt mit Kohlensäure gefällt. Das Filtrat vom Baryumcarbonat wurde wieder mit Brucin behandelt, vom überschüssigen Brucin mit Äther befreit und eingeengt. Das Brucinsalz schied sich zunächst amorph aus, wurde aber durch einmaliges Umkrystallisieren bzw. Verdunsten der wässerigen Lösung in langen glänzenden Krystallen vom Schmelzpunkt 189<sup>0</sup> erhalten.

D. Nachweis: s. bei „Gepaarte Glycuronsäuren“ im Kapitel „Körperfremde Stoffe“.

## II. Kresol.



A. Vorkommen. Kresol macht den Hauptbestandteil der im Menschen- und Pflanzenfresser-Harn enthaltenen Phenole aus. Nach Mooser kommt sogar im Kuhharn Phenol selbst gar nicht vor

<sup>1)</sup> Wohlgemuth, a. a. O. 1085.



und von den Menschenharnen, die Mooser untersuchte, lieferte nur einer, der von einem Vegetarianer stammte, viel Phenol. Von den drei isomeren Kresolen ist bisher nur das p-Kresol im Harndestillat mit Sicherheit nachgewiesen. Die Annahme, dass vielleicht auch geringe Mengen o-Kresol darin vorkämen, stützt sich auf den Befund von Brieger, dass man bei der Kalischmelze der Harnphenole neben viel p-Oxybenzoesäure auch etwas Salicylsäure erhält. Da aber Baumann gezeigt hat, dass mit organischen Substanzen verunreinigtes Phenol, das frei von o-Kresol ist, schon in kleinen Mengen beim Schmelzen mit Kali nachweisbare Mengen Salicylsäure liefert, so ist der Schluss auf das Vorkommen von o-Kresol im Harndestillate unberechtigt. Ebenso wenig ist das Vorkommen von m-Kresol im Destillat des Pferdeharns dadurch bewiesen, dass Preusse<sup>1)</sup> bei der Kalischmelze des Phenolgemenges eine Säure erhielt, die er nach Entstellung und Eigenschaften für m-Oxybenzoesäure ansprach.

Das Kresol ist zuerst von Staedeler aus Kuhharn erhalten und Taurylsäure genannt worden, daneben erhielt er ein „schwach gelb gefärbtes, stickstoffhaltiges Öl von durchdringendem Geruch“, dem Mooser<sup>2)</sup> in neuerer Zeit seine Aufmerksamkeit wieder zugewandt hat. Er erhielt durch Petroläther-Extraktion aus der alkalischen Kresolösung ein dem Kresol isomeres öliges, stickstofffreies Produkt, dem er den Namen Urogon (s. u.) gab.

B. Eigenschaften. I. 1. Das Parakresol (1,4) bildet eine weisse, krystallinische Masse von phenolartigem, an faulen Harn erinnernden Geruch, schmilzt bei 35—36°, siedet bei 197—199°, löst sich schwer in Wasser, leicht in Alkohol und in Äther. Wie das Phenol und die beiden anderen Kresole verflüchtigt es sich leicht mit Wasserdämpfen.

2. Es verbindet sich, wie das Phenol, mit Basen; in Barytwasser ist es schwerer löslich als das Phenol. Seine wässrige Lösung färbt sich mit Eisenchlorid schön blau.

3. Beim Erwärmen mit konzentrierter Schwefelsäure bildet es u. a. Kresolmetasulfonsäure  $\left. \begin{smallmatrix} \text{HO} \\ \text{CH}_3 \end{smallmatrix} \right\} \text{C}_6\text{H}_3\cdot\text{SO}_2\cdot\text{OH}$ , deren Eisenoxysalz eine violette Farbe besitzt; sie ist ferner durch ein selbst in kochendem Wasser schwer lösliches, in feinen Nadeln krystallisierendes, basisches Barytsalz,  $\text{C}_7\text{H}_6\text{SO}_4\text{Ba} + 2 \text{H}_2\text{O}$ , ausgezeichnet.

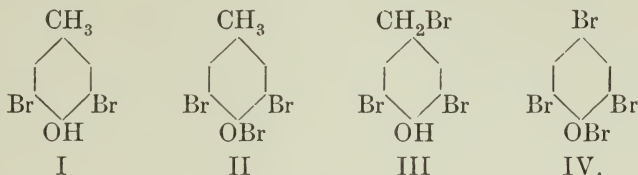
<sup>1)</sup> W. Mooser, Ztschr. f. physiol. Chem. **63**. 155. 1909. — L. Brieger, Ztschr. f. physiol. Chem. **4**. 205. 1880. — E. Baumann, ebenda **3**. 252. 1879. — C. Preusse, ebenda **2**. 355. 1878.

<sup>2)</sup> G. Städel, Liebigs Ann. d. Chem. **77**. 17. 1851. — W. Mooser, a. a. O. 183.

4. Eine heiss gesättigte Lösung von Pikrinsäure in 50%igem Alkohol gibt mit einer alkoholischen Parakresollösung nach Goedike<sup>1)</sup> keinen Niederschlag.

5. Eine wässrige Parakresollösung gibt mit überschüssigem Bromwasser im Gegensatz zum Phenol nur langsam eine Trübung.

Nach Autenrieth und Beuttel<sup>2)</sup> können unter der Einwirkung des überschüssigen Broms vier verschiedene Substanzen entstehen, nämlich 3,5-Dibrom-p-Kresol (I), 3,5-Dibrom-p-Kresolbrom (II), 3,5-Dibrom-p-Oxybenzylbromid (III) und schliesslich Tribromphenolbrom (IV).



Versetzt man eine wässrige p-Kresollösung mit Bromwasser bis zur Gelb- oder schwachen Rotfärbung und lässt das Gemisch unter häufigem Umschütteln nur 3—4 Stunden stehen, so erhält man einen Niederschlag, der aus den Verbindungen I und II besteht. Lässt man aber einen grossen Überschuss von gesättigtem Bromwasser 3—4—8 Tage einwirken, so besteht der Niederschlag aus fast reinem Tribromphenolbrom. Aber eine quantitative Überführung des Kresols in dieses Produkt scheint nicht möglich zu sein. Deshalb kann die früher verwandte gewichts-analytische Bestimmung der Phenole im Harn, die auf Wägung des Niederschlags mit Bromwasser im Hardestillate beruhte, nicht auf Exaktheit Anspruch machen.

Nach Siegfried u. Zimmermann<sup>3)</sup> entsteht bei Einwirkung von Brom ein unlösliches Tribromkresol, das durch Zusatz von Jodkalium unter bestimmten Bedingungen quantitativ in lösliches Dibromkresol übergeführt werden kann.

Weiteres s. bei Bestimmungsmethoden S. 788.

6. Mit Salpetersäure färbt sich das Parakresol gelb.

7. Versetzt man eine wässrige Parakresollösung mit Nitroprussidnatrium und Kalilauge, so wird die Flüssigkeit rotgelb, beim Übersättigen mit Essigsäure hellrosarot (v. Jaksch)<sup>4)</sup>.

8. Bei der Furfurolreaktion (s. Phenol B. 4. e.) färbt sich p-Kresol hellrot, später violett, schliesslich blau (v. Udránszky).

<sup>1)</sup> R. Goedike, Arch. des sc. biol. **2**. 422. 1893.

<sup>2)</sup> W. Autenrieth u. F. Beuttel, Arch. d. Pharmacie **248**. 114. 1910, dort Lit.

<sup>3)</sup> M. Siegfried u. R. Zimmermann, Biochem. Ztschr. **29**. 368. 1910, dort Lit.

<sup>4)</sup> v. Jaksch, Ztschr. f. klin. Med. **8**. 130. 1884.

9. Bei der Probe von Jacquemin (s. Phenol B. 4. o) gibt p-Kresol keine Blaufärbung, ebensowenig bei der Reaktion von Cotton (s. Phenol B. 4. n). Die Reaktionen können zur Unterscheidung der beiden Homologen verwandt werden.

10. Beim Schmelzen mit Kali wird es zu p-Oxybenzoesäure oxydiert.

11. p-Kresol-diphenylurethan wird dargestellt wie das entsprechende Phenol-derivat (s. Phenol B. 5). Es schmilzt bei 93—94° (Herzog).

12. p-Kresol (1,2 g) mit  $\alpha$ -Naphthylcyanat (1,7 g) ganz kurz in trockenem Glas erhitzt, gibt tafelförmige Blättchen von p-Kresol- $\alpha$ -naphthylurethan  $C_{10}H_7NH.CO.OC_6H_4.CH_3$ , die, zweimal aus absolutem Alkohol umkrystallisiert, bei 120° erweichen, bei 150—151° schmelzen (Neuberg und Hirschberg<sup>1</sup>).

13. Physiologisches Verhalten: Nach Baumann und Preusse wird p-Kresol vom Hunde in geringer Menge zu p-Oxybenzoesäure bzw. Phenol oxydiert, der grössere Teil wird als gepaarte Schwefel- und Glycuronsäure ausgeschieden. Jonescu<sup>2</sup>) fand 23—27% des verabreichten Kresols als „Phenole“ wieder.

C. Nachweis. Bei der Untersuchung kleiner Mengen Harn ist ein Nachweis des Kresols neben dem Phenol nicht durchführbar; die beim Nachweis des „Phenols“ aus dem Harn isolierte Substanz besteht ihrer Hauptmenge nach aus Kresol. Eine sichere Erkennung des Kresols neben dem Phenol lässt sich erreichen durch Überführen der Phenole in ihre Sulfonsäuren, von welchen das Barytsalz der Parasäure in Barytwasser unlöslich ist (Baumann), oder so, dass man die flüchtigen Phenole des Harns durch Schmelzen mit Kalihydrat in Oxybenzoesäuren überführt, wozu allerdings grössere Mengen der Phenole erforderlich sind. Nach beiden Methoden lassen sich auch isomere Kresole nebeneinander nachweisen.

Zur Darstellung der Sulfonsäure werden nach Baumann<sup>3</sup>) die Phenole mit dem gleichen Gewichte konzentrierter Schwefelsäure eine Stunde lang auf dem Wasserbade erwärmt, die Mischung nach dem Verdünnen mit Baryt neutralisiert, das Filtrat bis nahe zur Krystallisation verdampft und mit konzentriertem Barytwasser versetzt. Der Niederschlag besteht aus basischem p-kresolsulfonsauren Baryt, in Lösung befindet sich das phenolsulfonsaure und das o-kresolsulfonsaure Salz (s. oben unter A) neben einem Rest des p-kresolsulfonsauren Salzes, das durch Wiederholen des Verfahrens vollends abgeschieden wird.

Will man die Kresole als Oxybenzoesäuren nachweisen, so wird nach dem Schmelzen der Phenole mit Kalihydrat die Masse in Wasser gelöst, mit Schwefelsäure angesäuert, filtriert, das Filtrat in der Kälte mit kohlensaurem Natron alkalisch gemacht und das Phenol sowie das der Reaktion entgangene Kresol durch Schütteln mit Äther entfernt. Die bleibende wässrige Lösung dampft man ein und destilliert sie mit überschüssiger Salzsäure, wobei die entstandene Salicylsäure übergeht. Dem Destillationsrückstand entzieht man die in ihm noch enthaltenen Säuren mit Äther, verdunstet die ätherische Lösung und wäscht aus ihr einen Rest Salicylsäure mit Chloroform aus, wobei Paraoxybenzoesäure zurückbleibt (Preusse<sup>4</sup>).

<sup>1</sup>) C. Neuberg u. E. Hirschberg, Biochem. Ztschr. 27. 342. 1910.

<sup>2</sup>) D. Jonescu, Biochem. Ztschr. 1. 399. 1906; dort Lit.

<sup>3</sup>) E. Baumann, Ztschr. f. physiol. Chem. 6. 185. 1882.

<sup>4</sup>) Preusse, ebenda 2. 355.

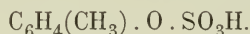
Um das Fehlen ansehnlicher Mengen von Phenol in einer Lösung p-Kresol festzustellen, liesse sich die Reaktion von Jacquemin (B. 9.) benutzen.

Arnold und Werner<sup>1)</sup> empfehlen zur Unterscheidung von Phenol und Kresol folgende Reaktion: Zu 10 ccm der wässerigen Lösung setzt man je 10 ccm Alkalilauge und Alkohol und einen Tropfen Anilin und schüttelt tüchtig, dann setzt man 5—6 Tropfen Wasserstoffsuperoxyd und nach wiederholtem Schütteln 10—12 Tropfen Natriumhypochloritlösung zu. Phenol gibt hierbei eine vorübergehende, schmutzig rote, rasch in Gelb übergehende Färbung, p-Kresol gibt eine vorübergehende violettrote Färbung, die rasch verschwindet.

D. Darstellung. Über die Darstellung von Kresol aus grossen Mengen Kuhharn siehe bei „Urogon“ (S. 783).

### Anhang.

#### 1. p-Kresolschwefelsäure.



Das p-kresolschwefelsaure Kalium wird ebenso wie das phenolschwefelsaure Salz (s. S. 775) synthetisch gewonnen. Es ist äusserlich kaum von diesem zu unterscheiden und verhält sich ebenso gegen Säuren, Wasser und Alkalien; nur löst es sich schwerer in Wasser und in Alkohol, zersetzt sich schneller beim Aufbewahren und widersteht der Fäulnis nicht so energisch. Mit Eisenchlorid färbt es sich nicht. Bei 140—150° verwandelt es sich in Kresolsulfonsäure (Baumann). In alkalischer Lösung wird die p-Kresolschwefelsäure nach Heymann und Koenigs<sup>2)</sup> durch Permanganat zu p-Oxybenzoesäure oxydiert.

Die Kresolschwefelsäure lässt sich am besten aus Pferdeharn gewinnen, und zwar nach demselben Verfahren, wie die Phenolschwefelsäure. Ein kürzeres Verfahren, bei welchem ein zwar nicht ganz reines, aber doch vorwiegend aus parakresolschwefelsaurem Kali bestehendes Salz erzielt wird, hat Brieger<sup>3)</sup> angegeben.

Frischer Harn wird nacheinander mit Bleizucker und Bleiessig ausgefällt, das Filtrat mit Schwefelwasserstoff behandelt, die Flüssigkeit im Wasserbad zum Sirup eingedampft und einige Zeit im Vacuum stehen gelassen. Das Salz krystallisiert dabei in Plättchen aus, die wiederholt aus viel heissem absoluten Alkohol umkrystallisiert werden müssen. Für die quantitative Bestimmung ist das Verfahren nicht geeignet, da im Bleiessigniederschlag ein Teil der Säure verloren geht.

<sup>1)</sup> C. Arnold u. G. Werner, Apotheker-Zeitung **20**. 925. 1905.

<sup>2)</sup> Baumann, Ztschr. f. physiol. Chem. **2**. 340. 1879. — B. Heymann und W. Königs, Ber. d. chem. Gesellsch. **19**. 704. 1886.

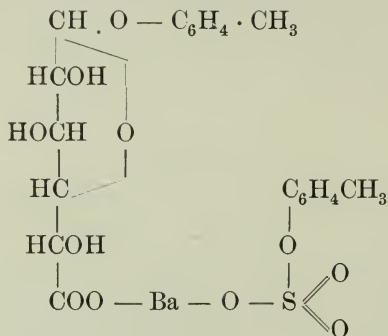
<sup>3)</sup> L. Brieger, Ztschr. f. physiol. Chem. **8**. 311. 1884.



## 2. p-Kresolglycuronsäure.

Die Säure ist synthetisch bisher nicht dargestellt. Sie kommt im normalen Harn wohl neben Phenolglycuronsäure (s. S. 775) vor. Ob in der von Wohlgemuth isolierten Säure ein Gemisch beider Homologen oder eines von beiden vorlag, ist unentschieden.

Aus dem Harn von Hunden, die 50 g p-Kresol in Tagesdosen von 1 g erhalten hatten, isolierten Neuberg und Kretschmer<sup>1)</sup> auf folgende Weise ein gemischtes Bariumsalz der Kresolglycuronsäure und Kresolschwefelsäure von der Formel  $C_{20}H_{22}O_{11}SBa + H_2O$ , dem wohl die Zusammensetzung



zukommt.

Der Urin wurde mit Ammoniak schwach alkalisch gemacht und auf dem Wasserbade auf ein Volum von etwa 3 Liter eingedampft. Der braun gefärbte, von auskrystallisierten Salzen abgeessene Harn wurde mit 100 g in Wasser gelöster krystallisierter Phosphorsäure angesäuert und 6 mal mit einem Gemisch aus 2 Teilen Äther und 1 Teil Alkohol ausgeschüttelt; nach Zusatz von weiteren 50 g Phosphorsäure wurden nochmals 6 Ausschüttelungen vorgenommen. Die sorgfältig abgetrennten Ätherauszüge wurden durch trockne Filter filtriert und nach Zusatz von gefällttem Bariumcarbonat auf dem Wasserbad abdestilliert. Das Stossen der Flüssigkeit wurde durch eingelegte Holzstäbchen vermieden. Die vereinigten Destillationsrückstände wurden durch Eindampfen in einer Emailschele unter Zusatz von etwas Wasser vom noch vorhandenen Alkohol befreit. Nach dem Erkalten erstarrte der Schaleninhalt zu einem Krystallbrei, der mit mehreren Litern Wasser ausgekocht und siedend vom Bariumcarbonat abfiltriert wurde. Die bei dem Eindampfen ausgeschiedenen Krystallkrusten, die sich beim Stehen noch vermehrten, wurden abgesaugt, mit kaltem Wasser gewaschen und aus heissem Wasser unter Zusatz von etwas Knochenkohle umkrystallisiert.

<sup>1)</sup> C. Neuberg u. E. Kretschmer, Biochem. Zeitschr. 36. 15. 1911.

Das Salz krystallisiert in perlmutterglänzenden Blättchen. Die spezifische Drehung beträgt  $-34,55^{\circ}$ . Die Lösung des Salzes reduziert Fehlingsche Lösung nicht, nach Spaltung mit Salzsäure reduziert sie schon in der Kälte, gleichzeitig scheidet sie Bariumsulfat ab. Sie gibt die Tollenssche Naphthoresorcinreaktion, die Orcinreaktion erst nach langem Kochen; mit konzentrierter warmer Salzsäure färbt sie sich grün; der Farbstoff geht mit grüner Farbe in Amylalkohol, mit violetter in Äther.

### 3. Urogon (Mooser)<sup>1)</sup>.



Mooser erhielt bei der Verarbeitung von ca. 3000 Liter frischem Kuhharn auf Phenole das „Urogon“ genannte Öl auf folgende Weise.

Der Harn wurde portionsweise zu je 500 g mit 25 cem konzentrierter Schwefelsäure angesäuert und destilliert, bis im letzten Destillate keine Millonsche Reaktion mehr auftrat. Die vereinigten Destillate wurden mit Calciumcarbonat alkalisch gemacht und im Kohlensäurestrom nochmals destilliert. Die Destillate wurden mit Kalilauge leicht alkalisch gemacht und durch eine erstmalige Ausschüttelung mit reinstem Petroläther im Scheidetrichter die Hauptmenge des Öls daraus gewonnen. Die wässrige alkalische Lösung wurde auf dem Wasserbade konzentriert und im Extraktionsapparat erschöpfend mit Petroläther extrahiert, dann mit Schwefelsäure angesäuert und wieder mit Petroläther extrahiert, bis die wässrige Lösung keine Millonsche Reaktion mehr gab. Nach dem Abdunsten des Petrolätherextrakts aus saurer Lösung blieb ein braunschwarzer Rückstand, der, bei 15 mm Druck destilliert, konstant zwischen  $133-134^{\circ}$  überging. Das farblose, lichtbrechende, dickflüssige Öl erwies sich durch den Siedepunkt (in vier Fraktionen zwischen  $198,5-203^{\circ}$  und die Analyse als reines p-Kresol und liess sich durch schnelles Abkühlen mit fester Kohlensäure in schönen Krystallen erhalten.

Das mit dem Kresol isomere Öl siedet bei  $199,5^{\circ}$  (korr.), hat das spezifische Gewicht 1,0201 bei  $15^{\circ}$ , den Brechungsexponent 1,5289 bei  $24^{\circ}$  und hat den charakteristischen Geruch des faulen Kuhharns. In Wasser ist es unlöslich, in Alkohol, Äther, Petroläther, Benzol, Aceton und Eisessig leicht löslich. In Alkalien ist es zunächst unlöslich, doch verschwindet die milchige Suspension beim Erhitzen unter Entwicklung eines an Cymol erinnernden Geruchs. Millons Reagens färbt die kleinsten Spuren primelrot.

Beim Erhitzen des Öls zunächst mit 5%iger Kalilauge am Rückflusskühler, dann des Reaktionsprodukts mit Kalilauge 1:1 im Einschlussrohr bei Wasserbadtemperatur bildet das Öl einen Urogon genannten Kohlenwasserstoff von der wahrscheinlichen Zusammensetzung  $\text{C}_{21}\text{H}_{42}$  und ein Urogol genanntes Phenol, dessen Analyse wieder annähernd die Zusammensetzung des Kresols zeigt, und dessen Eigenschaften nur wenig von denen des p-Kresols abweichen.

Die Beziehungen des Urogons zum Kresol, namentlich die Frage, ob es sich nicht nur um ein verunreinigtes Kresol handelt, bedürfen noch der weiteren Untersuchung.

Bei längerem Stehen des Harns soll sich nach Mooser das Urogon teilweise in ein Phenol (Urogol?) umwandeln. So sollen sich Differenzen bei der Phenolbestimmung im frischen Kuhharn und in solchem, der 4 Wochen gestanden hat, erklären.

<sup>1)</sup> W. Mooser, Ztschr. f. physiol. Ch. 63. 183. 1909.

## Bestimmung des Phenols und Kresols.

### 1. Gemeinsame Bestimmung des Phenols und p-Kresols.

a) Methode von Messinger und Vortmann in der Ausführung von Kossler und Penny<sup>1)</sup>.

A. Prinzip. Das Verfahren beruht darauf, dass nach den Ermittlungen von Kossler und Penny unter bestimmten Bedingungen durch Hypojodit das Phenol in Trijodphenol, das Kresol in Trijodkresol übergeführt wird. Zur Bildung des Trijodphenols sind auf 1 Mol. Phenol mehr als 3 Mol. Hypojodit und 3 Mol. freies Jod und zur Bildung von Trijodkresol mehr als 7 Mol. Hypojodit und 10,75 Mol. freies Jod erforderlich, oder 1 ccm 0,1 normal Jodlösung auf 3 mg Phenol oder 1 mg Parakresol, und die nötige Menge Lauge. Die Reaktion vollzieht sich langsam in der Kälte. Die Phenole werden in verdünnter Natronlauge gelöst und die erwärmte Flüssigkeit mit der nach der Menge Lauge berechneten Menge Jod versetzt. Dann wird angesäuert, wobei wie S. 255 dargetan, alles zur Bildung des Produkts nicht verbrauchte Jod frei wird, und dieses mit Natriumthiosulfat zurücktitriert.

#### B. Erfordernisse.

1. Zehntelnormal-Jodlösung. Von dieser zeigt 1 ccm 1,567 mg Phenol oder 1,8018 mg Kresol an.
2. Eine auf die Jodlösung gestellte Natriumthiosulfatlösung. Beide wie S. 256.
3. Nitritfreie Zehntelnormal-Natronlauge.
4. Stärkelösung.

C. Ausführung. Die Phenole werden aus dem mit Schwefelsäure angesäuerten Harn abdestilliert. Dabei können ausserdem in das Destillat übergehen Aceton, Ameisensäure und salpetrige Säure, von welchen Aceton und Ameisensäure Jod binden, die salpetrige Säure aus Jodkalium Jod frei macht. Ferner können flüchtige aldehydartige Substanzen, welche gleichfalls Jod binden, nach Salkowski und Ken Taniguti<sup>2)</sup> entstehen, wenn der Harn mit der Schwefelsäure stark eingedampft wird. Das Ammoniak, welches beim Kochen normalen Harns entweicht, wird zurückgehalten, wenn der Harn mit einer genügenden Menge Schwefelsäure versetzt worden ist. Die durch die fremden Substanzen verursachten Fehler lassen sich aber vermeiden, wenn man zur Gewinnung der Phenole aus dem Harn in folgender Weise verfährt.

<sup>1)</sup> J. Messinger u. G. Vortmann, Ber. d. chem. Gesellsch. **23**. 2753. 1890. — A. Kossler u. E. Penny, Ztschr. f. physiol. Chem. **17**. 117. 1892.

<sup>2)</sup> Ken Taniguti, Ztschr. f. physiol. Chem. **14**. 746. 1890. — E. Salkowski, Pflügers Archiv **56**. 339. 1894.

Man dampft 500 ccm Harn bei schwach alkalischer Reaktion in einer Schale auf dem Wasserbad auf ein Fünftel ein, wobei das Aceton entweicht. Den Rückstand bringt man durch Zusatz von Wasser wieder auf das ursprüngliche Volumen, setzt auf 100 ccm 5 ccm konzentrierte Schwefelsäure zu und destilliert am absteigenden Kühler die Hälfte ab. Man ersetzt die abdestillierte Flüssigkeit durch Wasser und wiederholt die Destillation noch einige Male immer unter Ergänzung des ursprünglichen Volumens. Die Vorlagen können während der Destillation offen sein, ohne dass man Phenol verliert. Die ersten 2 oder 3 Destillate fängt man zusammen auf, die folgenden jedes für sich. Man kann nicht durch Reaktionen erfahren, ob man schon alles Phenol abdestilliert hat, weil diese nicht empfindlich genug sind, sondern erfährt das erst durch die quantitative Bestimmung. Nach unveröffentlichten Versuchen von Holland kann die Destillation wesentlich abgekürzt werden, wenn man den angesäuerten Harn kalt mit Natriumsulfat halb sättigt. Die Ameisensäure und die salpetrige Säure entfernt man durch Schütteln der Destillate mit kohlensaurem Kalk bis zum Verschwinden der sauren Reaktion. Die Flüssigkeit destilliert man vom Kalkcarbonat ab und verwendet das bei der ersten Portion rückständige Salz zum Neutralisieren der folgenden. Das Destillat wird jetzt in Flaschen mit eingeriebenen Stopfen aufgefangen.

Die Destillate werden mit einer abgemessenen Menge der Zehntelnormallauge stark alkalisch gemacht (wofür für das erste Destillat aus normalem Harn 20 ccm genügen), durch Eintauchen in Wasser von 60° erwärmt und sogleich mit 10—15 ccm mehr Zehntelnormal-Jodlösung versetzt, als man Lauge genommen hat. Nach dem Erkalten spült man das sublimierte Jod mit der Flüssigkeit von der Wand der Flasche ab, säuert an und titriert das übrig gebliebene Jod mit der Thiosulfatlösung zurück, in der Art, wie bei der Bestimmung des Acetons S. 259.

Die Flüssigkeit enthält die jodierten Phenole als roten Niederschlag, erscheint also bei gleichzeitiger Gegenwart von Jodstärke violett. Der Farbumschlag von Violett in Rot, der mit der Wegnahme der letzten Spur freien Jods eintritt, ist aber scharf zu erkennen.

#### b) Modifikation von Neuberg<sup>1)</sup>.

Neuberg stellte fest, dass bei Anwesenheit von Kohlehydraten oder andren Substanzen, die beim Erhitzen mit Säuren flüchtige, jodbindende Substanzen geben (Salkowski), die Phenolwerte nach Kossler-Penny viel zu hoch ausfallen, weil diese flüchtigen Spaltungsprodukte als Phenole mitbestimmt werden.

<sup>1)</sup> C. Neuberg, Ztschr. f. physiol. Chem. **27**. 123. 1899.



Er empfiehlt deshalb folgende Modifikation, die bei Anwesenheit reduzierender Substanzen notwendig erscheint:

Das über Calciumcarbonat rektifizierte Gemenge der Phenole und der aus den Kohlehydraten entstandenen jodbindenden Produkte wird in einem 2 Liter-Kolben mit einer Auflösung von 1 g Ätznatron und 6 g festem Bleizucker versetzt und etwa 15 Minuten auf einem lebhaft siedenden Wasserbad erhitzt. Hierbei löst sich ein Teil des Bleioxyds in den Phenolen zu basischen Bleiphenolaten, während die leicht flüchtigen Aldehyde entweichen. Zur vollständigen Entfernung der letzteren erhitzt man den Kolbeninhalt noch kurze Zeit am absteigenden Kühler auf freier Flamme, bis wenige Kubikzentimeter des übergehenden Destillats ammoniakalisch-alkalische Silberlösung nicht mehr reduzieren, was gewöhnlich nach etwa 5 Minuten der Fall ist. Unnötig langes Erhitzen ist zu vermeiden, da bei anhaltender Erwärmung die Bleiphenolate in ihre Komponenten zerfallen.

Hierauf wird die Flüssigkeit mit Schwefelsäure stark angesäuert und abermals destilliert. Das Destillat wird nach Kossler und Penny weiter behandelt, d. h. alkalisch gemacht, mit Jodlösung versetzt usw.

Bei zuckerhaltigen Hundeharnen versagt nach meinen Erfahrungen die Methode zuweilen, da es nicht gelingt, alle aldehydartigen, Silberlösung reduzierenden Substanzen aus der alkalischen Lösung abzudestillieren, ohne dass Phenole mit übergehen. Für den Kuhharn haben Liechti und Mooser Verluste von etwa 50% des vorhandenen Kresols festgestellt, wenn sie zuvor das ganze Furfurol abdestillierten, und ähnliche Verluste erhielt M. Hensel<sup>1)</sup> bei zuckerhaltigem Menschenharn nach Neubergs Methode.

#### c) Modifikation von Mooser.

Mooser gelangte bei der Prüfung des Verfahrens von Kossler und Penny mit reinen Phenol- und Kresollösungen zu dem Schlusse, dass dabei ein Verlust von Phenol und Kresol entsteht. Er fand weiter, dass bei der Destillation reiner Kresollösungen mit Schwefelsäure nicht alles Kresol aus dem Destillat wieder zu gewinnen ist. Er destillierte deshalb zur Abscheidung der Phenole den Harn mit Phosphorsäure und nahm die zweite Destillation mit Calciumcarbonat in einem Kohlensäurestrom vor. Auf diese Weise wurden bei reinen Lösungen von Phenol und Kresol genaue Werte durch Titration des Destillats erhalten. Nach Mooser werden bei der Destillation von Kresollösungen mit Phosphorsäure auch bei Zusatz von Traubenzucker die Resultate

<sup>1)</sup> P. Liechti und W. Mooser, Zeitschr. f. physiol. Chem. **73**. 365. 1911.  
— M. Hensel, ebenda, **78**. 373. 1912.

nicht beeinflusst. Diese Tatsache wird indes von Neuberg und Hildesheimer bestritten<sup>1)</sup>. Sie sahen bei der Destillation von reinem Traubenzucker mit Phosphorsäure jodbindende Substanzen ins Destillat übergehen. Liechti und Mooser haben sich in erneuten Versuchen von der Berechtigung dieser Einwände nicht überzeugen können, ebenso fand M. Hensel, dass bei genauem Einhalten der Mooserschen Versuchsbedingungen Zuckerzusatz das Resultat nicht beeinträchtigt.

Als Nachteil der Destillation mit Schwefelsäure führt Mooser an, dass aus dem Kuhharn bei fortgesetzter Destillation mit der Säure auch das „gelbe Öl“ ins Destillat geht, das von den Phenolen verschieden ist.

Das Verfahren von Mooser gestaltet sich wie folgt:

Eine abgemessene, schwach alkalisch gemachte Menge Harn (250–500 ccm) wird auf dem Wasserbad auf ca.  $\frac{1}{5}$  eingedampft, in den Destillationskolben gespült und dieser mit dem Kühler verbunden. Durch den hier (Fig. 40) abgebildeten Hahntrichter, der zugleich als Destillationsaufsatz dient, lässt man unter zeitweiligem Umschütteln soviel sirupöse Phosphorsäure (Gehalt an  $P_2O_5$  65,03%, entspr. 96,86%  $H_3PO_4$  in den Versuchen von Mooser) langsam zufließen, dass deren Menge ca. 5% des ursprünglichen Harnvolums ausmacht. Unter guter Kühlung wird alsdann bis auf ca. 100 ccm abdestilliert und die Destillation nach jeweiligem Nachfüllen von 50 ccm Wasser so lange wiederholt, bis die Prüfung einiger Tropfen des Destillats mit Millons Reagens negativ ausfällt. Die in einem geräumigen Kolben aufgefangenen Destillate werden nach Übersättigen mit kohlensaurem

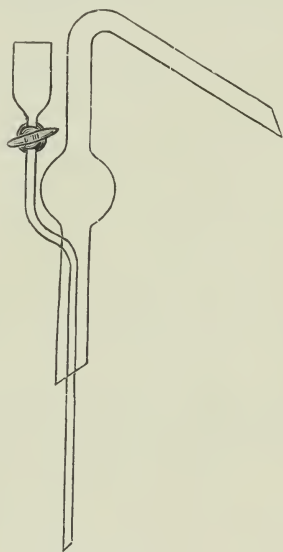


Fig. 40.

Kalk unter Einleiten eines reinen Kohlensäurestromes einer erneuten Destillation unterworfen und diese ebenfalls wiederholt, bis das Destillat keine Millonsche Reaktion mehr gibt. Das Destillat wird nach Kossler-Penny titriert, wobei zu beachten ist, dass infolge der im Destillate enthaltenen Kohlensäure die Menge der zuzusetzenden Natronlauge entsprechend vermehrt werden muss.

<sup>1)</sup> W. Mooser, Ztschr. f. physiol. Chem. 63. 161. 1909. — C. Neuberg und A. Hildesheimer, Biochem. Ztschr. 28. 525. 1910.

d) Ausschüttelungs-Verfahren von Ellinger-Hensel<sup>1)</sup>.

A. Prinzip. Das nach c) erhaltene Destillat des mit Phosphorsäure versetzten Harns wird erschöpfend mit Äther ausgeschüttelt, die Ätherlösung durch Schütteln mit  $\text{NaHCO}_3$ -Lösung zunächst von flüchtigen Säuren befreit, dann so lange mit verdünnter Natronlauge geschüttelt, bis die Phenole vollständig in die Lauge übergegangen sind. In der alkalischen Lösung werden nach Neutralisation der Hauptmenge der freien Lauge durch Schwefelsäure die Phenole nach Kossler und Penny titriert.

B. Ausführung. 500 ccm Harn werden schwach alkalisch gemacht und auf dem Wasserbade auf ungefähr 100 ccm abgedampft, in den Destillationskolben gespült (mit Spülwasser ungefähr 150 bis 200 ccm) und 25 ccm sirupöse Phosphorsäure dazu gebracht (spez. Gew. 1,7 entspr. 84,7%  $\text{H}_3\text{PO}_4$ ). Am absteigenden Kühler wird abdestilliert bis auf 100 ccm, jeweils 50 ccm  $\text{H}_2\text{O}$  nachgefüllt und so oft destilliert, bis die Millonsche Probe negativ ausfällt. Die Zahl der notwendigen Destillationen ist sehr verschieden (6—20). Soweit also wird genau nach Moosers Vorschrift verfahren. Das Destillat wird 4 mal mit etwa  $\frac{1}{5}$ — $\frac{1}{4}$  seines Volumens Äther, der durch 5 maliges Ausschütteln mit verdünnter Natronlauge gereinigt ist, ausgeschüttelt, die Ätherlösung sodann erst 4 mal mit 4%iger  $\text{NaHCO}_3$ -Lösung und schliesslich 4 mal mit annähernd  $n/1$ -NaOH-Lösung. Die NaOH wird in der phenolhaltigen alkalischen Lösung soweit neutralisiert, dass ihre Alkaleszenz 20 ccm  $n/10$  NaOH entspricht. Waren z. B. 250 ccm  $n/1$ -NaOH verbraucht, so werden 248 ccm  $n/1$ - $\text{H}_2\text{SO}_4$  zugesetzt. In der alkalischen Lösung werden durch Titration nach Kossler und Penny die Phenole bestimmt.

Die Methode wurde durch Kontrollbestimmungen mit reinen Phenollösungen und an Harnen mit Phenolzusatz — auch bei Anwesenheit von Kohlehydraten — geprüft und brauchbar gefunden. Die Werte stimmen mit den nach Methode c) erhaltenen gut überein. Sie führt durch Fortfall der Destillation über Calciumcarbonat schneller zum Ziele als die Moosersche, erfordert aber etwas mehr manuelle Arbeit.

## 2. Getrennte Bestimmung von Phenol und p-Kresol nach Siegfried und Zimmermann<sup>2)</sup>.

Die getrennte Bestimmung von Phenol und p-Kresol in dem nach Neuberg oder Mooser erhaltenen Harndestillate knüpft an die

<sup>1)</sup> M. Hensel, Zeitschr. f. physiol. Chem. 78. 373. 1912.

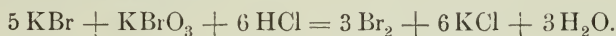
<sup>2)</sup> M. Siegfried u. R. Zimmermann, Biochem. Ztschr. 29. 368. 1910; dort Lit. u. 34. 462. 1911.

Bestimmungsmethoden von Koppeschaar und Keppler an, die für Phenol allein sehr brauchbare Resultate liefert, für Gemenge mit Kresol aber nicht anwendbar ist.

Über das Destillationsverfahren von Siegfried und Zimmermann und seine Fehlerquellen siehe unter C.

A. Prinzip. I. Es wird die Menge Brom ermittelt, die das Phenol und das Kresol zusammen verbrauchen, indem aus ersterem Tribromphenol, aus letzterem Tribromkresol entsteht ( $b_1$ ). Dies kann entweder geschehen durch eine Bestimmung nach Kossler-Penny und Umrechnung des verabreichten Jods auf Brom oder genauer mittels der modifizierten Methode Koppeschaar-Keppler.

Im letzteren Falle wird dem Phenolgemenge eine titrierte Kaliumbromatbromid-Mischung zugesetzt, die mit Salzsäure ein bestimmtes Quantum Brom entwickelt.



Unter den sub C angegebenen Bedingungen wird das p-Kresol quantitativ in Tribromkresol übergeführt, das Phenol in Tribromphenol. Das nicht gebundene Brom wird ermittelt, indem Jodkaliumlösung zugefügt wird. Dann wird eine dem nicht gebundenen Brom äquivalente Menge Jod frei, die durch Titration mit Natriumthiosulfat zu ermitteln ist.

Da Tribromkresol aber durch Jodkalium in Dibromkresol übergeführt wird, so muss es vor dem Jodkaliumzusatz durch Filtration entfernt werden (s. Kresol B. 5.).

II. In einer zweiten Bestimmung wird diejenige Menge Brom ( $b_2$ ) ermittelt, die nötig ist, um durch Einwirkung von Brom und nachherigen Zusatz von Jodkalium das Kresol in Dibromkresol, das Phenol in Tribromphenol überzuführen.

Die Berechnung geschieht in folgender Weise:

x sei die gesuchte Menge Kresol, y die gesuchte Menge Phenol.

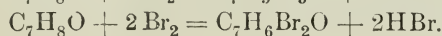
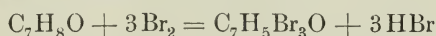
Molekulargewicht des Kresols = 108,06

Molekulargewicht des Phenols = 94,05

Atomgewicht des Broms = 79,92.

$b_1 - b_2$  ist die Menge Brom, die von dem vorhandenen Kresol (x) nach der Bestimmung II weniger verbraucht wird als nach der Bestimmung I. Diese Menge beträgt

für 1 Mol. Kresol 2 Atome, denn





Also ist:

$$[I] \quad \frac{x}{108,06} = \frac{b_1 - b_2}{159,84}$$

oder:

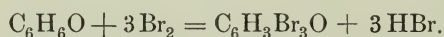
$$x = \frac{108,06 (b_1 - b_2)}{159,84} = 0,67605 (b_1 - b_2)$$

Die Brommenge, die der unbekannten Menge Phenol (y) entspricht, wird durch die Differenz der in der ersten Bestimmung ermittelten Brommenge  $b_1$  und der dem Kresol (x) entsprechenden Menge

Brom erhalten, d. i.  $\frac{x \cdot 479,52}{108,06}$ .

Die gesuchte Menge Phenol (y) verhält sich zu dieser Brommenge wie das Molekulargewicht des Phenols (94,05) zu dem Gewicht von 6 Atomen Brom (479,52).

Denn:



Also:

$$[II] \quad \frac{y}{b_1 - x \cdot \frac{479,52}{108,06}} = \frac{94,05}{479,52}$$

Setzt man x aus Gleichung (I) ein, so ist

$$y = \left( b_1 - \frac{0,67605 [b_1 - b_2] 479,52}{108,06} \right) \cdot \frac{94,05}{47,952}$$

$$y = b_1 \cdot 0,19613 - (b_1 - b_2) 0,5854$$

$$y = b_2 \cdot 0,5884 - b_1 \cdot 0,3923.$$

## B. Erfordernisse.

1.  $n_{10}$ -Natriumthiosulfatlösung.

2. Kaliumbromatbromidlösung, im Liter 0,384 g Kaliumbromat und 2,97 g Kaliumbromid enthaltend. Der Titer wird folgendermassen bestimmt: In einer verschliessbaren Flasche von ca. 250 ccm Inhalt werden 100 ccm der Lösung mit 10 ccm 25%iger Salzsäure und mit 15 ccm 5%iger Jodkaliumlösung vermischt. Das freie Jod wird mit  $n_{10}$ -Thiosulfatlösung titriert, wobei die Stärkelösung erst gegen Ende der Reaktion zugefügt wird, d. h. wenn die Flüssigkeit nur noch gelb gefärbt ist. 1 ccm  $n_{10}$  Thiosulfatlösung = 7,992 mg Brom.

3. 5%ige Jodkaliumlösung, die nach Ansäuern mit verdünnter Schwefelsäure Stärkelösung nicht bläuen darf.

4. Stärkelösung aus löslicher Stärke bereitet.

5. Schwefelsäure, aus gleichem Volum Wasser und konzentrierter Schwefelsäure bereitet.

6. ca. 25%ige Salzsäure.

### C. Ausführung.

#### a) Destillation der Phenole in Dampfstrom.

Der mit Natronlauge bis zur schwach alkalischen Reaktion versetzte Harn wird in einer Schale auf dem Wasserbad bis auf etwa  $\frac{1}{5}$  des ursprünglichen Volumens eingedampft und in den Destillationskolben übergeführt. Dieser ist durch einen dreifach durchbohrten Gummistopfen ausser mit dem Destillationsrohr und dem den Wasserdampf zuleitenden Rohre mit einem Hahntrichter versehen, durch den bei den folgenden Manipulationen sowohl die Schwefelsäure als das in Wasser aufgeschwemmte Natriumbicarbonat eingeführt wird. Auf diese Weise soll ein Verlust an Phenolen durch Verdampfen oder Mitfortgerissenwerden durch Kohlensäurebläschen vermieden werden. Durch den Hahntrichter wird die abgekühlte Mischung von gleichen Teilen konzentrierter Schwefelsäure und Wasser (pro Liter Harn je 100 ccm des Gemisches) zugefügt; es wird mit Wasserdämpfen unter gleichzeitiger Erhitzung des Destillationskolbens so lange (bzw. länger) destilliert, bis das Destillat die Millonsche Reaktion nicht mehr gibt.

Dieses Destillat wird im Kolben mit 30–40 g in Wasser aufgeschlemmten Natriumbicarbonats durch den Hahntrichter vermischt und unter Durchleiten eines Kohlensäurestroms, den man vorteilhaft schon durch den Wasserdampf-Entwickler führt, wieder bis zum Versagen der Millonschen Reaktion oder länger destilliert. Dieses Destillat wird nach Neuberg (s. S. 785) mit der Mischung der wässerigen Lösungen von 1 g Natronhydrat und 6 g Bleiacetat (pro Liter Harn) im Kolben versetzt, auf einem siedenden Wasserbade 15 Minuten stehen gelassen, dann, bis alkalisch-ammoniakalische Silbernitratlösung nicht mehr reduziert wird, abdestilliert. Hierauf wird mit Schwefelsäure (1:1) durch den Hahntrichter stark angesäuert und mit Wasserdämpfen bis zum Versagen der Millonschen Reaktion destilliert. Das Destillat wird mit einem grossen Überschusse von Natronlauge auf dem Wasserbade eingeeengt, im Messkolben auf 200 ccm aufgefüllt und darin, wie unter b) beschrieben, die Grösse  $b_1$  und  $b_2$  bestimmt.

Siegfried und Zimmermann haben zwar durch Kontrollversuche festgestellt, dass nach ihrer Methode der Destillation im Wasserdampfstrom zuerst unter Schwefelsäurezusatz, dann unter Zusatz von  $\text{NaHCO}_3$  und Einleiten von  $\text{CO}_2$  Phenole quantitativ in das Destillat übergehen. Aber die Fehler der Neubergschen Modifikation, die Mooser und Hensel aufgedeckt haben, dürften auch seinem Verfahren anhaften. Deshalb scheint es mir nötig, so lange nicht durch erneute Kontrollversuche Klarheit geschaffen ist, auch für die getrennte Bestimmung des Phenols und Kreosols das nach Moosers Vorschrift (s. S. 786) gewonnene Destillat zu verwenden.

## b) Titration der Phenole.

I. Bestimmung von  $b_1$ .

In einer ca. 500 ccm fassenden, mit Glasstopfen versehenen Engshalsflasche versetzt man die genau gemessene Menge der wässerigen Lösung des Phenolgemisches (sofern sie nicht wenigstens 100 ccm beträgt, verdünnt man sie mit Wasser auf dies Volum) mit 20–30 ccm Schwefelsäure (1:1), schüttelt um und fügt aus einer Bürette unter Umschwenken zunächst soviel der Kaliumbromatbromidlösung zu, bis sich beim Schütteln der Niederschlag zusammenballt und die Flüssigkeit deutlich gelb gefärbt ist. Dann lässt man noch den achten Teil der angewandten Menge Lösung hinzufließen und lässt die Mischung gut verschlossen unter öfterem, kräftigen Schütteln 1 Stunde lang stehen. Hierauf wird unter Vermeiden von Bromverlust durch Glaswolle in 25–30 ccm 5%ige Jodkaliumlösung filtriert, die erste Flasche mit Wasser gut nachgespült, mit diesem zur Absorption freier Bromdämpfe gut durchgeschüttelt und mit diesem Wasser der Niederschlag ausgewaschen. Im Filtrate wird mit  $n/10$ -Thiosulfatlösung das Jod titriert.

II. Bestimmung von  $b_2$ .

Die gleiche Menge der Lösung des Phenolgemisches wie in I versetzt man in einer mit Glasstopfen versehenen Literflasche mit ca. 30 ccm 25%iger Salzsäure und verdünnt bis auf ca. 500 ccm mit Wasser. Dann fügt man unter gleichmäßigem langsamem Umschwenken diejenige Menge Bromatbromidlösung hinzu, die nach der  $b_1$ -Methode bis zur Gelbfärbung der Flüssigkeit verbraucht wurde, und lässt die Mischung ohne zu schütteln gut verschlossen 15 Minuten stehen. Es kommt hierbei hauptsächlich darauf an, dass der entstehende Niederschlag sehr feinflockig ausfällt, was man nur durch ganz vorsichtiges Umschwenken erzielt.

Nach 15 Minuten versetzt man die Mischung mit 25–30 ccm 5%iger Jodkaliumlösung, schüttelt allmählich um, bis die Flüssigkeit gleichmäßig gefärbt ist, und lässt die Mischung 1 Stunde vor Licht geschützt stehen. Darauf schüttelt man mehrere Male kräftig durch und titriert das freie Jod mit  $n/10$ -Natriumthiosulfatlösung.

Die Berechnung erfolgt auf Grund der S. 789 u. 790 entwickelten Gleichungen:

$$x = 0,67605 (b_1 - b_2),$$

$$y = 0,5884 b_2 - 0,3923 b_1.$$

Beispiel: Bei der Bestimmung von  $b_1$  seien 32 + 4 ccm Bromatbromidlösung mit einem Bromwert von 0,1721 g zugesetzt und 4,45 ccm Thiosulfatlösung entsprechend 4,45 · 0,007992 g Br zurücktitriert, dann ist  $b_1 = 0,1721$  g — 0,0356 g = 0,1365 g. — Bei der Bestimmung von  $b_2$  seien 32 ccm Bromatbromidlösung (entsprechend 0,1530 g Br) zugesetzt und 6,9 ccm Thiosulfatlösung zurücktitriert, dann ist  $b_2 = 0,1530$  g — 6,9 · 0,007992 g = 0,0979 g.

Daraus ergibt sich  $x = 0,0261$  g,  $y = 0,0041$  g.

Die Methode gibt gute Resultate, wie Siegfried und Zimmermann neuerdings gegenüber Einwänden von Ditz und Bardach<sup>1)</sup> gezeigt haben.

### 3. Kolorimetrische bzw. spektrophotometrische Bestimmungen des Phenols.

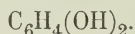
Einige optische Bestimmungsmethoden seien hier nur ihrem Prinzip nach erwähnt, weil sie nur für die Bestimmung des Phenols ausgearbeitet sind, während im Harn bzw. Harndestillat sich vorzugsweise Kresol findet.

a) Bonanni<sup>2)</sup> bestimmte den Extinktionskoeffizienten und das Absorptionsverhältnis der gefärbten Verbindung, die Phenol mit Eisenchlorid bildet, und schlug vor, unter Anwendung dieser Konstanten Phenol direkt im Harn zu bestimmen.

b) Bordas und Robin<sup>3)</sup> führen das Phenol im Harndestillat entweder durch Erwärmen mit gesättigter Kaliumnitratlösung und konzentrierter Schwefelsäure in Pikrinsäure über und bestimmen diese kolorimetrisch als Ammoniumpikrat, oder sie benutzen zur kolorimetrischen Bestimmung die Rotfärbung, die eintritt, wenn wässrige Phenollösung und Stickstoffdioxid mit gesättigter Schwefelsäure zusammen erhitzt werden.

c) Kiesel<sup>4)</sup> destilliert den Harn mit Schwefelsäure und das Destillat nochmals nach Übersättigen mit Soda. Im zweiten Destillate wird die Intensität der Millonschen Reaktion kolorimetrisch mit einer Normallösung verglichen, die auf 3 Teile p-Kresol 1 Teil Phenol enthält.

## III. Brenzkatechin.



Syn. Orthodioxybenzol 1,2.

A. Vorkommen. Das Brenzkatechin findet sich regelmässig im Harn des Menschen, in etwas grösserer Menge im Pferdeharn als Brenzkatechin-Schwefelsäure, im Carnivorenharn und im Harn von Kaninchen nach Milchfütterung fehlt es ganz; es stammt aus der im Pflanzenreich weit verbreiteten Protokatechusäure (Brenzkatechincarbonsäure)  $(\text{HO})_2 \cdot \text{C}_6\text{H}_3 \cdot \text{COOH}$  (Preusse). Reichlicher kommt es nach dem Gebrauch von Phenol und phenolschwefelsaurem Salz (Baumann und Preusse, Brieger) oder Benzol (Nencki und Giacosa, Schmiedeberg) als Brenzkatechin-Schwefelsäure im Harn vor. Das

<sup>1)</sup> M. Siegfried und R. Zimmermann, *Biochem. Zeitschr.* **38**. 434. 1912. — H. Ditz und Fr. Bardach. ebenda **37**. 272. 1911.

<sup>2)</sup> A. Bonanni, Moleschotts Untersuch. z. Naturlehre Bd. **17**. zit. n. Jahrsb. f. Tierch. **30**. 122. 1900.

<sup>3)</sup> F. Bordas et L. Robin, *Compt. rend. Soc. Biol.* **50**. 87. 1898.

<sup>4)</sup> K. Kiesel, *Monatschr. f. prakt. Tierheilk.* **15**. **84**. 1904. zit. n. Jahrsb. f. Tierch. **34**. 104.



eine Zeitlang für Brenzkatechin gehaltene und ihm sehr ähnliche Alkapton Boedekers<sup>1)</sup> ist kein Brenzkatechin, sondern eine Alkaptonsäure. (S. Homogentisinsäure.)

Brenzkatechin gibt Moscatelli<sup>2)</sup> an im Harn eines Kaninchens aufgefunden zu haben, welchem Pasteur'scher Lyssaimpfstoff injiziert worden war.

B. Eigenschaften. 1. Das Brenzkatechin krystallisiert aus Wasser oder Äther in tetragonalen Prismen, aus Benzol in breiten Tafeln, schmilzt bei 102—104°, siedet bei 240—245° und sublimiert in glänzenden rechtwinkeligen Plättchen. Es löst sich leicht in Wasser, in Alkohol und in Äther, ferner in heissem Toluol und zum Unterschied vom Hydrochinon in kaltem Benzol. Mit Wasserdämpfen ist es etwas flüchtig (Fittig).

2. Seine Lösungen färben sich bei Gegenwart von Alkalihydraten oder kohlen-sauren Alkalien an der Luft unter Absorption von Sauerstoff grün, grün-braun, braun und endlich schwarz. Seinen mit kohlen-saurem Alkali versetzten Lösungen lässt es sich mit Äther entziehen. Mit essigsäurem Blei gibt es im Gegensatz zum Hydrochinon einen weissen, in Essigsäure löslichen Niederschlag. Aus wässriger Lösung wird es nach Böttinger durch eine ammoniakalische Chlorkaliumlösung als saures Salz  $(HO.C_6H_4.O)_2Ca$  gefällt und unterscheidet sich dadurch gleichfalls vom Hydrochinon (und Resorcin). — Bei Zusatz einer heiss-gesättigten Lösung von Pikrinsäure in 50%igem Alkohol zu einer Lösung von Brenzkatechin in 50%igem Alkohol fällt nach Goedike<sup>3)</sup> eine krystallinische Verbindung beider Körper nach gleichen Molekülen.

3. Mit pyroschwefelsaurem Kali setzt sich das Brenzkatechin in alkalischer Lösung zu brenzkatechin-diäther- und monoätherschwefelsaurem Kali um. Das Salz der Diätherschwefelsäure,  $C_6H_4(SO_4K)_2$ , bildet ein in absolutem Alkohol unlösliches weisses Krystallpulver, dessen wässrige Lösung mit Eisenchlorid keine Farbenreaktion gibt. Das Kalisalz der Monoätherschwefelsäure,  $HO.C_6H_4.SO_4K$ , krystallisiert nach dem Verdunsten seiner alkoholischen Lösung in farblosen glänzenden Plättchen, die sich leicht in Wasser lösen, und deren wässrige Lösung durch Eisenchlorid violett wird (Baumann). Beide Ätherschwefelsäuren zer-setzen sich bei der Einwirkung von Mineralsäuren und nach Preusse<sup>4)</sup> gleichfalls leicht beim Faulen des Harns.

4. Eisenchlorid färbt Brenzkatechinlösung sofort dunkelgrün, weiterhin wird die Flüssigkeit schwarz; die Reaktion tritt auch noch bei Verdünnungen ein, bei welchen Phenol mit Eisenchlorid nicht mehr gefärbt wird. Macht man die grüne Lösung (bei Gegenwart von Weinsäure) mit Ammoniak alkalisch, so färbt sie sich bei wenig Ammoniak violett, bei viel Ammoniak kirschrot; beim Übersättigen mit Essigsäure wird sie wieder grün, mit Ammoniak wieder violett oder kirschrot. Die Rotfärbung ist viel intensiver als die Grünfärbung (Hlasiwetz und Barth; Ebstein und Müller). — Versetzt man eine Brenzkatechinlösung mit 2 Tropfen 20%iger Eisenchloridlösung und 1 ccm Sulfanilsäurelösung, so tritt eine intensive dunkelrotbraune Färbung ein; die Reaktion ist erheblich empfindlicher als die Grünfärbung mit Eisenchlorid (Bayer)<sup>5)</sup>. Adrenalin gibt die gleichen Farbenreaktionen.

<sup>1)</sup> Preusse, Ztschr. f. physiol. Ch. 2. 329. — Baumann und Preusse, Ztschr. f. physiol. Ch. 3. 157. 1879. — Brieger, Du Bois' Archiv 1879. Suppl. 67. — Nencki u. Giacosa, Ztschr. f. physiol. Ch. 4. 336. 1880. — O. Schmiedeb-berg, Archiv f. exper. Pathol. 14. 306. 1881. — Boedeker, Ztschr. f. rat. Med. 3] 7. 130. 1859; Ann. d. Ch. u. Pharm. 117. 98. 1861.

<sup>2)</sup> R. Moscatelli, Virchows Archiv 128. 181. 1892.

<sup>3)</sup> H. Böttinger, Chemiker-Ztg. 19. 23; Chem. Zentralbl. 1895. 4. 332. — R. Goedike, Archives des sc. biol. 2. 422. 1893.

<sup>4)</sup> Baumann, Ztschr. f. physiol. Ch. 2. 343. 1878. — Preusse, Ztschr. f. physiol. Ch. 2. 384. 1878.

<sup>5)</sup> Ebstein u. Müller, Virchows Archiv 65. 394. 1875. — G. Bayer, Bio-chem. Ztschr. 20. 178. 1909.

5. Mit einem Tropfen 2% iger Natriumbichromatlösung gekocht, gibt Brenzkatechin eine rotbraune Färbung; die Empfindlichkeit der Probe wird ebenfalls durch Zusatz von Sulfanilsäure erhöht, die Färbung ist mehr rot (Bayer). Auch diese Reaktionen gibt das Adrenalin.

6. Eine Brenzkatechinlösung reduziert salpetersaures Silber, Goldchlorid, Platinchlorid, übermangansaures Kali schon in der Kälte, alkalische Kupferoxydlösung in der Wärme, dagegen nicht Wismuthoxyd.

7. Bei der Furfurolprobe (S. 768; I. B. 4. e.) färbt sich Brenzkatechin tief kirschrot, später violett (v. Udránszky)<sup>1)</sup>.

8. Die Phenolprobe von Guareschi (I. B. 4. c; S. 768) gibt das Brenzkatechin nicht. Mit Diazobenzolsulfonsäure in stark alkalischer Lösung färbt es sich dunkelrot (Penzoldt und Fischer).

9. Alvarez<sup>2)</sup> gibt folgende Farbenreaktion des Brenzkatechins an: In eine 30 cm Porzellanschale gibt man 0,2 g granuliertes, völlig trockenes Natriumperoxyd, 0,04–0,05 g Brenzkatechin und 5 cm absoluten Alkohol. Nach 4–6 Minuten setzt man 15 cm destilliertes Wasser zu. Der Alkohol wird vorübergehend hell fleischfarbig, nach 5 oder 6 Minuten grün, schliesslich braun. Ein Tropfen auf Porzellan gebracht und geblasen, wird blaugrün. Der Zusatz von Wasser macht die Flüssigkeit rotbraun.

C. Nachweis. Brenzkatechin enthaltende Harne färben sich bei alkalischer Reaktion an der Luft schnell dunkel. Zur Darstellung des Brenzkatechins empfiehlt Baumann<sup>3)</sup> nach Brieger, sowie nach Nencki und Giacosa folgendes Verfahren.

Der Harn wird mit Salzsäure stark angesäuert,  $\frac{1}{2}$  Stunde auf dem Wasserbad erwärmt und nach dem Erkalten mit Äther extrahiert; die Ätherauszüge werden zur Entfernung der Salzsäure und organischen Säuren so oft mit erneuerter Sodalösung geschüttelt, als sich diese noch färbt, der Äther verdunstet und der Rückstand mit kleinen Mengen gesättigter Kochsalz- oder Glaubersalzlösung extrahiert, wobei Phenol und Kresol neben anderen Stoffen grösstenteils ungelöst zurückbleiben. Die Salzlösungen, in welchen Brenzkatechin und Hydrochinon enthalten sein können, werden nach dem Verdünnen mit Wasser so lang destilliert, als flüchtige Phenole übergehen; nach dem Erkalten wird der Destillationsrückstand wieder mit Äther ausgezogen und der Äther verdunstet. Der zurückbleibende Sirup, welcher bei Gegenwart von nicht allzu kleinen Mengen von Hydrochinon krystallinisch erstarrt, wird in Wasser gelöst und unter Vermeidung eines Überschusses mit Bleizucker ausgefällt; der Niederschlag enthält das Brenzkatechin, während das Hydrochinon in Lösung geblieben ist. Der Niederschlag wird in Wasser verteilt, mit Schwefelsäure zersetzt und mit Äther ausgeschüttelt. Beim freiwilligen Verdunsten krystallisiert das Brenzkatechin, wenn es in nicht zu kleinen Mengen vorhanden ist, in kaum gefärbten Prismen. Durch Umkrystallisieren aus heissem Benzol lässt es sich reinigen.

Schmiedeberg<sup>4)</sup> destilliert den Harn mit Salzsäure, bis keine merklichen Mengen von flüchtigen Phenolen mehr übergehen, extrahiert den Retortenrückstand nacheinander mit Äther und Essigäther, verdunstet, erwärmt die rückständige Masse nach dem Lösen in Wasser mit Bariumcarbonat und schüttelt das Filtrat abermals mit Äther aus. Beim Verdunsten krystallisiert das Brenzkatechin (mit dem Hydrochinon) aus.

Eine Trennung beider Dioxybenzole kann man, ausser durch das oben angegebene Verfahren, nach Baumann auch durch Ausziehen der trockenen Substanz

<sup>1)</sup> L. v. Udránszky, Ztschr. f. physiol. Ch. 12. 355. 1888.

<sup>2)</sup> E. P. Alvarez, Chem. News 91. 125. zit. n. Chem. Zentralbl. 1905. I. 1415.

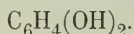
<sup>3)</sup> E. Baumann, Ztschr. f. physiol. Ch. 8. 188. 1883.

<sup>4)</sup> O. Schmiedeberg, Archiv f. exper. Pathol. 14. 305. 1881.

mit kaltem Benzol erzielen; das Brenzkatechin geht in Lösung und das Hydrochinon bleibt zurück.

Zur Erkennung des Brenzkatechins ist am besten das Verhalten desselben gegen Eisenchlorid geeignet (B. 4.). Man darf nur wenig einer verdünnten Eisenchloridlösung hinzusetzen. Ammoniak würde Eisenoxyd niederschlagen; um dies zu verhüten, fügt man der Probe vorher etwas Seignettesalz oder Weinsäure hinzu.

#### IV. Hydrochinon.



Syn. Paradioxybenzol 1,4.

A. Vorkommen. Das Hydrochinon ist bisher nur nach Gebrauch von Phenol und Benzol (Baumann und Preusse, Nencki, Brieger, Baumann<sup>1</sup>), sowie nach der Verabreichung von Hydrochinon selbst mit Bestimmtheit im Harn nachgewiesen worden; es ist in ihm als Ätherschwefelsäure enthalten. Doch auch der normale Pferdeharn enthält wahrscheinlich Spuren davon; denn die aus dem Pferdeharn gewonnene Fraktion, aus der das Hydrochinon auskrystallisieren musste (s. Brenzkatechin C.), lieferte zwar keine Hydrochinon-Krystalle, aber sie gab mit Eisenchlorid erwärmt deutlichen Chinongeruch (Baumann).

B. Eigenschaften. 1. Das Hydrochinon bildet rhombische Krystalle (Nadeln oder Tafeln), schmilzt bei 169° (Hlasiwetz), sublimiert bei vorsichtigem Erhitzen unverändert, gibt aber nach Baumann und Preusse, sowie nach Wolkow und Baumann<sup>2</sup>) bei schnellem Erhitzen sehr kleiner Mengen im offenen, weiten Reagenzglas einen violetten Dampf, der sich zu einem indigoblauen Sublimat verdichtet, dessen Farbe beim Hinzubringen von Lösungsmitteln wieder verschwindet. Es löst sich leicht in heissem Wasser, in Alkohol und in Äther; auch löst es sich in heissem Toluol. In kaltem Benzol ist es sehr schwer löslich und unterscheidet sich dadurch vom Brenzkatechin.

2. Gegen Alkalien verhält es sich wie das Brenzkatechin (über das Verhalten gegen Ammoniak und Anilin s. bei Homogentisinsäure B. 9, 10). Durch essigsaures Blei wird es im Gegensatz zum Brenzkatechin nicht gefällt, ebenso wenig nach Böttinger durch ammoniakalische Chlorecalciumlösung. Mit Brom gibt es keinen Niederschlag (Landolt<sup>3</sup>).

3. Es reduziert, wie das Brenzkatechin, leicht Metalloxyde; durch oxydierende Substanzen, z. B. Eisenchlorid, wird es in Chinon übergeführt.

4. Mit Millonschem Reagens gibt nach Wolkow und Baumann<sup>4</sup>) das Hydrochinon in der Kälte einen amorphen gelben Niederschlag, der in der Wärme ziegelrot wird.

5. Bei der Probe nach Alvarez (s. Brenzkatechin B. 9.) färbt sich der Alkohol sofort intensiv rötlichgelb, der Tropfen auf Porzellan wird flüchtig blau, mit Wasser orange.

<sup>1</sup>) Baumann, Ztschr. f. physiol. Ch. 6. 190. 1882.

<sup>2</sup>) Baumann u. Preusse, Ztschr. f. physiol. Ch. 3. 157. 1879. — Wolkow u. Baumann, daselbst 15. 251. 1891.

<sup>3</sup>) H. Böttinger, Chemiker-Ztg. 19. 23; Chem. Zentralbl. 1895. 1. 332. — H. Landolt, Berichte d. chem. Gesellsch. 4. 773. 1871.

<sup>4</sup>) Wolkow u. Baumann, a. a. O. 245.



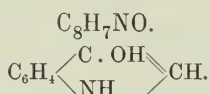
6. Von den Ätherschwefelsäuren hat Baumann die Mono-, Kühling<sup>1)</sup> die Diätherschwefelsäure dargestellt. Das Kalisalz der Monosäure krystallisiert in farblosen rhombischen Tafeln.

C. Nachweis. Hydrochinonhaltige Harne dunkeln bei alkalischer Reaktion schnell an der Luft. Das Hydrochinon wird aus denselben ebenso dargestellt wie das Brenzkatechin.

Beim Ausfällen der Dioxybenzole mit essigsäurem Blei bleibt das Hydrochinon in Lösung. Zur Gewinnung des Hydrochinons aus dieser Lösung verfährt man in folgender Weise. Das Filtrat vom Bleiniederschlag wird mit Schwefelsäure zersetzt, mit kohlensaurem Baryt erwärmt, das Filtrat mit Äther ausgezogen und der nach dem Verdunsten des Äthers hinterbleibende, bald krystallinisch erstarrende, gelbe bis braune Rückstand aus siedendem Benzol oder Toluol umkrystallisiert.

Erkannt wird das Hydrochinon an der Entwicklung violetter Dämpfe und der Bildung eines blauen Sublimats bei schnellem Erhitzen, ferner an der Entwicklung des Geruchs nach Chinon beim Kochen mit Eisenchlorid.

## V. Indoxyl.



Das Indoxyl, dessen Indican benannte Ätherschwefelsäure  $\text{C}_8\text{H}_6\text{N.O.SO}_2.\text{OH}$  im Harn vorkommt, liefert die Hauptmenge des aus dem Harn darstellbaren Indigblaus und Indigrots.

Aus normalem und pathologischem Harn lässt sich, wie schon seit langer Zeit bekannt ist, blauer und roter Farbstoff gewinnen, welcher verschiedene Namen erhielt: Cyanurin (Braconnot, Semmola), Uroglaucin und Urrhodin (Heller), Urocyanin (Martin), Harnblau (Virchow), und in dessen blauem Anteil von A. Hill Hassall, sowie von Sicherer Indigblau erkannt wurde. Schunck hielt die Substanz, von welcher das Indigblau abstammt, für identisch mit dem Chromogen der Indigpflanzen, dem Indican. Auch machte Schunck den ersten Versuch, das Indican aus dem Harn zu isolieren. Nachdem aber F. Hoppe-Seyler die Verschiedenheit des Harn- und Pflanzenindicans, und Jaffe durch Fütterungsversuche in dem Indol die Muttersubstanz des Harnindicans erkannt hatten, gelang Baumann der Nachweis, dass das Harnindican eine den Phenolschwefelsäuren analoge Ätherschwefelsäure eines Oxydationsproduktes des Indols, des Indoxyls, ist. In Gemeinschaft mit Brieger und Tiemann hat Baumann<sup>2)</sup> dann weiter die Eigenschaften der Indoxylschwefelsäure festgestellt.

Neben der Indoxylschwefelsäure kommt noch ein zweiter Indoxylabkömmling, die Indoxylglycuronsäure, im Harn vor, von welcher, als leichter zersetzlicher Verbindung, das bei der Fäulnis des Harns auftretende Indigblau abstammt.

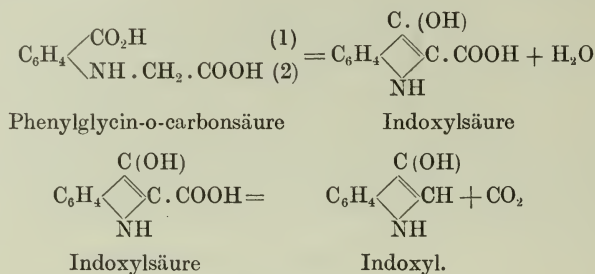
Das Indoxyl selbst ist zuerst von Baumann und Tiemann aus der Indoxylschwefelsäure des Harns erhalten, dann von Baeyer aus o-Nitrophenylpropionssäure synthetisch gewonnen und als ein in Wasser lösliches, unbeständiges, leicht ver-

<sup>1)</sup> Baumann, Ztschr. f. physiol. Ch. 2. 344. 1878. — O. Kühling, Über Stoffwechselprodukte aromatischer Körper. Diss. Berlin 1887; Zentrabl. f. d. med. Wissensch. 1888. 525.

<sup>2)</sup> Arth. Hill Hassall, Philos. Magaz. [4] 6. 226. 1853. — Sicherer, Ann. d. Ch. u. Pharm. 90. 120. 1854. — Baumann, Pflügers Archiv 13. 304. 1876. — Baumann u. Brieger, Ztschr. f. physiol. Ch. 3. 254. 1879; Ber. d. chem. Gesellsch. 12. 2166. — Baumann u. Tiemann, Ber. d. chem. Gesellsch. 12. 1098 u. 1192. 1879; 13. 408. 1880.



harzendes Öl beschrieben worden. Im krystallinischen Zustand wurde es erst 1901 von Vorländer und Drescher<sup>1)</sup> dargestellt durch Zersetzung von Indoxylsäure mit warmem Wasser unter Leuchtgas, Filtrieren von ungelöstem Harz und Einstellen der gelben, grün fluoreszierenden Lösung in Eiswasser. Die Indoxylsäure ist durch das Verfahren der Natronschmelze von Phenylglycin-o-carbonsäure zu Zwecken der Indigo-Synthese jetzt ein leicht zugängliches Material geworden.



A. Vorkommen. Das Indoxyl entsteht im Körper als Oxydationsprodukt des Indols (Jaffe), das durch die Untersuchungen von Kühne und Nencki als Fäulnisprodukt der Eiweisskörper erkannt wurde. Von aufgenommenem Indol scheidet der Mensch nach Kauffmann etwa 50% als Indoxyl aus. Das durch Bakterienwirkung aus den Eiweisskörpern entstehende Indol stammt aus deren Tryptophan-komplex. Bringt man Tryptophan (Indolaminopropionsäure) direkt in den Dickdarm von Kaninchen, so kann etwa  $\frac{1}{3}$  der theoretisch möglichen Menge im Harn als gepaartes Indoxyl ausgeschieden werden, während per os gegebenes Tryptophan nicht zu einer Indicanvermehrung im Harn führt (Ellinger und Gentzen). Eiweisskörper und Albuminoide, die wie der Leim und das Zein keine Tryptophangruppe enthalten, bewirken keine vermehrte Indoxylausscheidung (Underhill<sup>2)</sup>).

Bedingungen für das Erscheinen von Indoxyl im Harn sind also die Einwirkung von Mikroorganismen, die der Indolbildung fähig sind, auf Tryptophankomplexe im Darm oder an anderen Stellen des Körpers, wie in Empyemen u. dgl., ferner eine ausreichende Resorption des gebildeten Indols und Oxydation des Indols zu Indoxyl. Bei dem letztgenannten Prozess scheint die Leber beteiligt zu sein. Denn nach Gautier und Hervieux bleibt bei Fröschen die Indicanausscheidung nach Injektion von Indol aus, wenn man ihnen die Leber exstirpiert. Andererseits sehen Gilbert und Weil<sup>3)</sup> auf Grund klinischer Be-

<sup>1)</sup> A. v. Baeyer, Ber. d. chem. Gesellsch. 14. 1744. 1881. — D. Vorländer, und B. Drescher, ebenda 34. 1856. 1901 und 35. 1701. 1902.

<sup>2)</sup> M. Kauffmann, Zeitschr. f. physiol. Chem. 71. 1. 1911. — A. Ellinger und M. Gentzen, Hofmeisters Beiträge 4. 171. 1904. — F. P. Underhill, Amer. Journ. of physiol. 12. 176. 1905.

<sup>3)</sup> Cl. Gautier u. Ch. Hervieux, Journ. de physiol. et path. 9. 593. 1907. — A. Gilbert u. E. Weil, Compt. rend. Soc. Biol. 52. 685. 1900.

obachtungen gerade Leberinsuffizienz als eine Ursache von Indoxylurie an.

Beim normalen erwachsenen Menschen und Säugetier sind die Bedingungen für die Indicanausscheidung durch die Darmfäulnis von Eiweisssubstanzen gegeben. Die Indoxylmenge (auf Indigo berechnet) schwankt etwa zwischen 5—20 mg in der Tagesmenge beim Menschen. Die Nahrung ist von erheblichem Einfluss. Fleischkost begünstigt die unter Indolbildung verlaufende Eiweissfäulnis, Kohlehydratzufuhr und Milchdiät setzen sie herab (Hirschler, Winternitz, Biernacki). Wang fand bei vorwiegender Fleischkost 15,9—20,1 mg, bei gemischter Kost 4,3—5,3 mg. Wesentlich höhere Werte (49 mg) fanden Sherwin u. Hawk bei eiweissreicher Kost ohne Fleisch. Auch im Hunger verschwindet das Indican nicht aus dem Harn (F. Müller), vielmehr halten sich die Werte dann meist zwischen denjenigen bei Fleischkost und den bei vorwiegender Kohlehydratnahrung auftretenden. Doch kann unter Umständen im Hunger das Indican bis auf Spuren verschwinden (Tuczek)<sup>1)</sup>. Nach Hattrem und Hawk drückt reichliches oder mässiges Wassertrinken die Indikanausscheidung herab.

Bei Hunden, Katzen und Kaninchen ist das Verhalten der Indicanausscheidung prinzipiell dasselbe wie beim Menschen, wie folgende Tabelle zeigt, die die Indigowerte der täglichen Harnmenge in mg gibt.

Nahrung	Katze	Hund	Kaninchen
	(F. Müller)	(F. Müller)	(Ellinger <sup>2)</sup> )
Eiweiss- + Kohlehydrate	0,65 (Erbsen)	1,05 (Erbsen)	0,8 (Hafer)
vorwiegend Eiweiss	4,8 (Fleisch)	11,2 (Fleisch)	7,8 (Nutrose)
vorwiegend Kohlehydrate	1,1 (Stärke)	1,1 (Stärke)	0 (Rüben)
Hunger	1,36	6,69	3,5

Im Kuhharn fand Salkowski etwa 27 mg pro Liter; besonders reich an Indican ist der Pferdeharn, in dem Jaffe bis 220 mg, Bauer<sup>3)</sup> 183 mg im Liter fand. Die Werte von Jaffe bedürfen einer Korrektur, weil dem gewogenen Indigo wohl Verunreinigungen angehaftet haben.

Wegen der Abwesenheit von Mikroorganismen im Darm Neugeborener findet sich in ihrem Harn kein Indican (Senator) und bei Brustkindern ist nach Hochsinger und Momidłowski<sup>4)</sup> der Harn in der Regel gleichfalls indicanfrei. Säuglinge, welche neben Frauenmilch auch Kuhmilch erhalten, haben trotz normaler Verdauung konstant kleine Mengen Indican im Harn.

<sup>1)</sup> A. Hirschler, Ztschr. f. physiol. Ch. 10. 306. 1886. — H. Winternitz ebenda 16. 460. 1892. — E. Biernacki, Deutsch. Arch. f. klin. Med. 49. 87. 1891. — E. Wang, Om Indicanuri, Christiania 1900. — C. P. Sherwin und P. B. Hawk, Journ. of biol. chem. 11. 169. 1911, dort Lit. — F. Müller, Mitt. aus d. Würzburger Klinik 2. 341. 1886. — F. Tuczek, Arch. f. Psychiatrie 15. 784. 1885.

<sup>2)</sup> A. Ellinger, Ztschr. f. physiol. Ch. 39. 44. 1903.

<sup>3)</sup> E. Salkowski, Ztschr. f. physiol. Ch. 42. 247. 1904. — E. Bauer, Nachweis und Bedeutung des Indicans im Harn des Pferdes. Inaug.-Diss. Giessen 1905.

<sup>4)</sup> H. Senator, Ztschr. f. physiol. Ch. 4. 1. 1879. — C. Hochsinger, Wiener med. Presse Nr. 40 u. 41. 1890. — St. Momidłowski, Jahrb. f. Kinderheilk. 36. 192. 1893.

Bei den steril ernährten Meerschweinchen von Nuttall und Thierfelder fehlte auch das Indoxyl im Harn. Bei Hunden gelingt es durch grosse Calomelgaben den Harn indoxylfrei zu machen (Baumann)<sup>1)</sup>.

Einen ganz besonders starken Einfluss auf die Indoxylvermehrung im Harn übt eine Stauung des Dünndarminhalts. Jaffe stellte das zunächst an Patienten mit hoch sitzenden Darmstenosen fest, und erreichte dann bei Hunden durch Unterbindung des Dünndarms hohe Indicanwerte, die bei Dickdarmunterbindung ausblieben. Ellinger und Prutz<sup>2)</sup> erzeugten experimentell bei Hunden noch weitergehende Stauungen des Darminhalts durch die Methode der „Darmgegenschaltung“: Sie trennten eine Darmschlinge aus der Kontinuität, vereinigten ihr unteres Ende mit dem zuführenden, ihr oberes Ende mit dem abführenden Darm, so dass an der oberen Naht, wo die Peristaltik der gegengeschalteten Schlinge der Peristaltik des zuführenden Darms entgegenarbeitete, eine intensive Stauung des Inhalts erfolgte. Nach Gegenschaltung im Dünndarm wurde bei einem grossen Hunde der Maximalwert von über 500 mg Indigo im Harn erreicht, bei Stauung im Dickdarm stiegen die Werte nur unbedeutend. Zeigten sich nach einigen Tagen erheblichere Anstiege, so lehrte die Autopsie am lebenden Tiere, dass die Ileocöcalklappe schlussunfähig geworden war und die Stauung sich bis in den Dünndarm erstreckte.

Für die Indicanmenge ist auch der Zutritt von Pankreassaft zum Darm von Bedeutung. Wird dieser durch Unterbindung der Pankreasausführungsgänge beim Hunde verhindert, so gehen die Indicanwerte herab (Pisenti)<sup>3)</sup>.

Unter Berücksichtigung aller angeführten Momente wie Resorptionsbedingungen, Peristaltik, Zutritt des Pankreassaftes zum Darm, Beschaffenheit der Darmflora, Lebertätigkeit, ergibt sich die Eiweissfäulnis im Darm als wichtigste Quelle der Indicanvermehrung, demnächst Indolbildung durch Mikroben-tätigkeit ausserhalb des Darmkanals bei Eiterungen, Verjauchungen usw., die meist quantitativ nicht so beträchtlich ist wie bei der Darmfäulnis (Porcher)<sup>4)</sup>.

Damit stimmen die klinischen Erfahrungen überein. Die höchsten Werte sind bei Dünndarmverschlüssen, bei Peritonitis mit Darmlähmung, Typhus abdominalis namentlich bei Darmblutungen und bei Carcinomen mit Sitz im Magen-Darmkanal beobachtet. Grössere Mengen als etwa 150 mg in der Tagesmenge dürften kaum gefunden sein (Lit. s. bei Wang, Scholz, Jaffe)<sup>5)</sup>.

<sup>1)</sup> E. Baumann, Ztschr. f. physiol. Ch. **10**. 123. 1886.

<sup>2)</sup> M. Jaffe, Virchows Arch. **70**. 72. 1877. — A. Ellinger u. W. Prutz, Ztschr. f. physiol. Ch. **38**. 399. 1903.

<sup>3)</sup> G. Pisenti, Arch. per le scienze med. **12**. Nr. 5. 1887; zit. n. Jahresb. f. Tierchem. **27**. 277.

<sup>4)</sup> Ch. Porcher, Compt. rend. de l'acad. d. scienc. **147**. 214. 1908.

<sup>5)</sup> E. Wang, Om Indicanuri, Christiania 1900. — H. Scholz, Beiträge zur Frage der Entstehung des Indicans im Tierkörper. Inaug.-Diss. Königsberg 1903. — M. Jaffe, Die deutsche Klinik am Eingange des 20. Jahrhunderts Bd. I. S. 199. 1903.



Schon in der grundlegenden Arbeit von Jaffe ist die Frage erörtert worden, ob auch eine Indolbildung ohne Mitwirkung von Bakterien im Organismus stattfinden und zur Indoxylurie führen könne, und die von Senator beobachtete starke Indicanreaktion bei manchen Konsumptionskrankheiten schien manchem eine Stütze für die Annahme, dass bei Zerfall von Körpereiwiss mehr Indican im Harn erschiene. Für diese Annahme sind auch Harnack und v. d. Leye auf Grund von Versuchen bei Oxalsäure-Vergiftung eingetreten und namentlich Blumenthal, Rosenfeld und Lewin deuteten ihre Beobachtungen an Kaninchen mit Zuckerstich und solchen, die mit Phloridzin vergiftet oder unterernährt waren, in diesem Sinne. Durch die Versuche von Scholz, P. Mayer, Ellinger, die zu anderen Resultaten gelangten, und durch die Kritik von Jaffe scheint mir die Beweiskraft jener Ergebnisse beseitigt zu sein. Auch die Beobachtungen von Moraczewski <sup>1)</sup>, dass Indolgehalt der Fäces und Indoxylgehalt des Harns nicht parallel gehen, kann als ein Beweis für die Entstehung von Indol bzw. Indican ohne Mikroben-tätigkeit nicht angesehen werden.

**B. Eigenschaften.** Das nach den oben erwähnten Vorschriften von Vorländer und Drescher rein dargestellte Indoxyl bildet gelbe flache Prismen vom Schmelzpunkt 85°. Es löst sich in Wasser, Alkohol, Äther, Chloroform, Eisessig und Benzol, besonders leicht in Aceton, sehr wenig in Petroläther. Die wässrige Lösung fluoresziert grün, die Fluoreszenz verschwindet auf Zusatz von überschüssiger Kalilauge oder Salzsäure, nicht von Sodalösung. Indoxyl ist im Vacuum kaum destillierbar, verflüchtigt sich jedoch teilweise unzersetzt beim Erhitzen für sich oder mit schwach überhitztem Wasserdampf (105 bis 110°); die Dämpfe riechen fäcal.

2. Säuert man eine mit Natriumnitrit versetzte wässrige Lösung von Indoxyl an, so scheiden sich schwach gelbliche, feine Nadeln aus (v. Baeyer <sup>2)</sup>, die



wahrscheinlich das Nitrosamin des Indoxyls  $\text{C}_6\text{H}_4 \begin{array}{c} \diagup \diagdown \\ \text{N.NO} \end{array} \text{CH}$  darstellen und beim Erwärmen mit Salzsäure Indigo liefern.

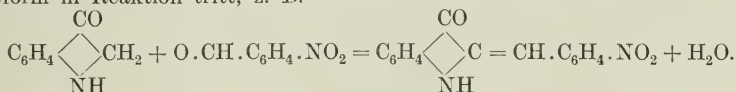
3. Mit salzsaurem Diazobenzol scheidet Indoxyl in verdünnter wässriger Lösung sehr schwer lösliche, rote Nadeln ab, die aus Alkohol umkrystallisiert bei



236° schmelzen und wahrscheinlich die Zusammensetzung  $\text{C}_6\text{H}_4 \begin{array}{c} \diagup \diagdown \\ \text{N} - \text{N}_2 \cdot \text{C}_6\text{H}_5 \end{array} \text{CH}$  besitzen.

Der Körper löst sich in erwärmter Natronlauge mit rotbrauner Farbe und wird durch Kohlensäure wieder ausgefällt. In sehr starker Verdünnung färben sich Indoxyllösungen mit salzsaurem Diazobenzol gelbrot (v. Baeyer).

4. Säuert man eine wässrige Lösung von Indoxyl, der man Paranitrobenzaldehyd, Terephtalsäurealdehyd, Anthroxanaldehyd in Eisessig oder Brenztraubensäure in wässriger Lösung zugesetzt hat, mit Salzsäure an, so entstehen beständige rote Niederschläge von Indogeniden, wobei das Indoxyl in seiner Ketoform in Reaktion tritt, z. B.



<sup>1)</sup> F. Rosenfeld, Hofmeisters Beiträge 5. 84. 1904 (Lit.). — A. Ellinger, Ztschr. f. physiol. Ch. 39. 44. 1903. — W. Moraczewski, zit. n. Jahresber. f. Tierch. 39. 395. 1909.

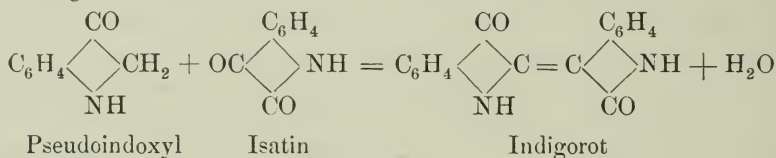
<sup>2)</sup> A. v. Baeyer, Ber. d. chem. Gesellsch. 16. 2190. 1883.



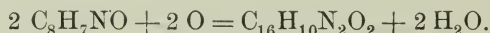
Das Indogenid des p-Nitrobenzaldehyds bildet, aus Aceton umkrystallisiert, rote Nadelchen vom Schmelzpunkt 273° (v. Baeyer).

5. Analog den beschriebenen Indogenidbildungen verläuft die Bildung von Indigorot aus Indoxyl und Isatin. Versetzt man eine Lösung von Indoxyl und Isatin in Alkohol mit Natriumcarbonat, so scheidet sich Indirubin in rotbraunen, metallglänzenden Nadeln aus (v. Baeyer). Auch sehr verdünnte Indoxyllösungen geben mit Isatinsalzsäure (20 mg Isatin in 1 Liter Salzsäure vom spez. Gew. 1,19) beim Erwärmen auf dem Wasserbad Indigrot, das durch Chloroform der Lösung entzogen werden kann. Die Reaktion ist zum Nachweis und zur Bestimmung von Indoxyl im Harn von Bouma<sup>1)</sup> verwendet worden.

Nach v. Baeyer vollzieht sich die Indigorotbildung nach folgender Gleichung:

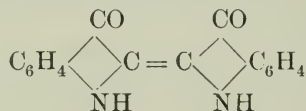


6. Indoxyl ist ausgezeichnet durch seine leichte Oxydierbarkeit. Das mit Säure aus der Indoxylschwefelsäure abgeschiedene Indoxyl verwandelt sich schon durch den Sauerstoff der Luft teilweise in Indigblau und Indigrot, von denen nach Nencki<sup>2)</sup> das Indigrot vorwaltet.



Eisenchlorid oxydiert es bei Gegenwart von Salzsäure schon in gelinder Wärme ebenso, während Eisenchlorid für sich einen weissen amorphen Niederschlag gibt, welcher sich in Berührung mit Salzsäure sofort in Indigblau und nur wenig Indigrot verwandelt. Ebenso verhalten sich Chlor, Brom und zahlreiche andere Oxydationsmittel, von denen beim Nachweis unter D. die Rede sein wird. Ausserordentlich rasch erfolgt seine Oxydation durch den Sauerstoff der Luft in alkalischer Lösung; eine solche überzieht sich alsbald mit einer Haut von Indigblau.

Dem Indigoblau kommt nach v. Baeyer die Formel



zu.

<sup>1)</sup> v. Baeyer, Ber. d. chem. Gesellsch. 14. 1745. 1881. — J. Bouma, Ztschr. f. physiol. Ch. 32. 82. 1901.

<sup>2)</sup> M. Nencki, Ber. d. chem. Gesellsch. 9. 299. 1876.

7. In konzentrierter Schwefel- oder Salzsäure ist das Indoxyl nach Baeyer verhältnismässig beständig, erwärmt man es dagegen mit verdünnter Salzsäure, so bildet sich unter Entwicklung eines unangenehmen Geruchs ein amorpher roter Körper. — Beim Erhitzen mit trockenem Baryumhydrat liefert das Indoxyl (indoxylschwefelsaures Kali) nach Baumann als einziges aromatisches Zersetzungsprodukt Anilin, mit Brom gibt es Tribromanilin (aus wässriger Lösung amorph, brauner, flockiger Niederschlag, Baumann<sup>1)</sup>, bei der Oxydation mit übermangansaurem Kali eine Säure von den Eigenschaften der Anthranilsäure.

8. Indoxylschwefelsäure. Beim Erwärmen einer konzentrierten Lösung von Indoxyl in Kali mit pyroschwefelsaurem Kali nach Baumanns Verfahren erhält man nach Baeyer<sup>2)</sup> das von Baumann und seinen Schülern aus Harn dargestellte (s. unter C.) indoxylschwefelsaure Kali  $C_8H_6N \cdot SO_2 \cdot OK$ .

Es bildet blendend weisse Tafeln und Plättchen, welche dem phenol- oder kresolschwefelsauren Kali sehr ähnlich sind, löst sich leicht in Wasser, sehr schwer in kaltem Alkohol, leichter in heissem. Lösungen des Salzes lassen sich beliebig oft abdampfen, bei Gegenwart von Kalilauge selbst mehrere Stunden auf 160—170° erhitzen, ohne dass sich die Säure zersetzt, in wässriger neutraler Lösung zerfällt das Salz aber bei 120—130° in saures schwefelsaures Kali und ein Gemenge von Indigblau und Indigrot. Mineralsäuren spalten schon in der Kälte, leichter beim Erwärmen, Indoxyl ab, welches sich an der Luft, schneller durch andere Oxydationsmittel in Indigblau und Indigrot verwandelt. Mit Essigsäure aber lässt sich eine Lösung des Salzes einige Zeit erhitzen, ohne dass sich die Säure zersetzt. Wird das Salz in einem trockenen Rohr schnell zum schwachen Glühen erhitzt, so sublimiert Indigo.

9. Die wenig bekannte Indoxylglycuronsäure ist noch weniger beständig als die indoxylschwefelsauren Salze. Auf ihre Zersetzung bezieht man die Abscheidung der Indigfarbstoffe aus Harn bei längerem Stehen desselben, beim Eindampfen und bei der alkalischen Harngärung.

Das Vorkommen der Indoxylglycuronsäure im normalen Harn wurde durch Neuberg und P. Mayer<sup>3)</sup> wahrscheinlich gemacht. Aus der Bleiessig-Ammoniakfällung des Alkohol-Ätherextrakts von 50 Liter angesäuertem Harn erhielten sie durch Zersetzung des Bleisalzes mit Schwefelwasserstoff eine linksdrehende Lösung, welche schwach die Reaktionen der gepaarten Glycuronsäuren, und nach der Hydrolyse die Reaktionen des Indoxyls bei den Proben von Jaffe und Obermayer (s. D.) gab.

<sup>1)</sup> E. Baumann, Ztschr. f. physiol. Ch. 1. 62. 1877.

<sup>2)</sup> A. v. Baeyer, Ber. d. chem. Gesellsch. 14. 1745. 1881.

<sup>3)</sup> C. Neuberg u. Mayer, Ztschr. f. physiol. Ch. 29. 256. 1900.

Die Anwesenheit von Indoxylglycuronsäure wurde aus der Linksdrehung und dem Reduktionsvermögen des Harns nach Verfüterung von Indol (Baumann, Külz) von Schmiedeberg erschlossen. Auch nach Verabreichung von Orthonitrophenylpropionsäure hat G. Hoppe-Seyler<sup>1)</sup> das Vorkommen von Indoxylglycuronsäure neben Indoxylschwefelsäure wahrscheinlich gemacht.

C. Darstellung des indoxylschwefelsauren Kalis aus Harn. Es ist zwar möglich, wie G. Hoppe-Seyler gezeigt hat, das Salz aus normalem (Hunde-) Harn zu gewinnen, auch aus einem unter pathologischen Verhältnissen an Indican reichen menschlichen Harn ist es von Otto<sup>2)</sup> dargestellt worden; doch ist da die Ausbeute nur sehr gering. Zweckmässiger verarbeitet man daher Harn (von Hunden), welcher nach der Verabreichung von indoxylbildender Substanz (Indol nach Baumann und Brieger, Orthonitrophenylpropionsäure nach G. Hoppe-Seyler) entleert worden ist.

a) Baumann und Brieger<sup>3)</sup> bedienen sich folgenden Verfahrens. Der Harn wurde zur Krystallisation verdampft, die braunrote Mutterlauge mit Alkohol von 90% extrahiert, der alkoholische Auszug in der Kälte mit alkoholischer Oxalsäurelösung ausgefällt, nach 10 Minuten der Niederschlag abfiltriert und das Filtrat sofort mit alkoholischer Kalilösung schwach alkalisch gemacht. Die abermals filtrierte Flüssigkeit wurde darauf auf etwa die Hälfte eingedampft und nun mit dem gleichen Volumen Äther versetzt, wodurch ein reichlicher sirupöser Niederschlag entstand, der neben Salzen, Harnstoff, Extraktivstoffen usw. den grösseren Teil des Indicans enthielt. Dieser Sirup wurde wiederholt mit Alkohol von 96% extrahiert und die Auszüge mit dem gleichen Volumen Äther gefällt. Bei Wiederholung dieses Verfahrens mit den Auszügen blieb endlich aller Harnstoff in Lösung, während der Alkohol einen Teil der Extraktivstoffe zurückliess. Zuletzt wurde die so gereinigte alkoholische Lösung mit so viel Äther versetzt, bis eine bleibende Trübung entstand; beim Stehen der Flüssigkeit in der Kälte schied sich das indoxylschwefelsaure Kali in Warzen mikroskopischer Tafeln an der Wand und in grossen durchsichtigen Tafeln in der Flüssigkeit selbst aus. Durch allmählichen weiteren Zusatz von Äther nahmen die Krystalle an Menge zu. Von zugleich abgeschiedener sirupöser Substanz liessen sie sich durch Abwaschen mit kaltem Alkohol befreien. Zuletzt wurden die Krystalle 1—2 mal aus heissem Alkohol umkrystallisiert.

b) Nach G. Hoppe-Seyler<sup>4)</sup> wird der Harn zum dünnen Sirup verdampft, mit 96%igem Alkohol ausgefällt und das Filtrat mit dem gleichen Volumen Äther von 0,722 Dichte versetzt. Die nach 24 Stunden abgegossene klare Flüssigkeit wird in der Kälte mit alkoholischer Oxalsäurelösung ausgefällt, schnell filtriert und mit konzentrierter Lösung von kohlen-saurem Kali schwach alkalisch gemacht. Vom Filtrat wird der Äther abdestilliert, der Rest (unter Erhaltung der alkalischen Reaktion) zum dicklichen Sirup eingedampft, dieser in der Kälte mit der 15- bis 20 fachen Menge absoluten Alkohols aufgenommen und in einem verschlossenen Gefäss einen Tag stehen gelassen. Der dabei entstandene Niederschlag wird mit 96%igem Alkohol ausgekocht und die Lösung der Krystallisation überlassen. Das Filtrat wird mit Äther gefällt, schnell von den zuerst ausfallenden Schmierungen abgegossen und in der Kälte längere Zeit stehen gelassen. Die Krystallplättchen, welche sich bald aus den beiden Lösungen ausscheiden, werden durch Umkrystalli-

<sup>1)</sup> O. Schmiedeberg, Arch. f. exper. Path. 14. 308. 1881. — G. Hoppe-Seyler, Ztschr. f. physiol. Ch. 7. 179 u. 425. 1882/83.

<sup>2)</sup> G. Hoppe-Seyler, Ztschr. f. physiol. Ch. 8. 79. 1883. — Jac. G. Otto, Pflügers Archiv 33. 612. 1884.

<sup>3)</sup> E. Baumann u. L. Brieger, Ztschr. f. physiol. Ch. 3. 255. 1879.

<sup>4)</sup> G. Hoppe-Seyler, Ztschr. f. physiol. Ch. 7. 423. 1883.



sieren aus heissem Alkohol gereinigt. — Zur Darstellung des Salzes aus normalem Hundeharn verwendete Hoppe-Seyler 25 l desselben.

c) Die älteren Methoden, nach welchen das Indican aus dem Harn durch essigsäures Blei und Ammoniak gefällt wird, liefern nur ein sehr unreines Präparat.

D. Nachweis. 1. Nach Jaffe<sup>1)</sup> wird das Indican in stark saurer Lösung mit unterchlorigsaurem Salz oxydiert. Das sich ausscheidende Indigblau führt man nach Stokvis durch Schütteln mit Chloroform in dieses über.

Man setzt in einem Reagenzglas zu Harn dasselbe Volumen konzentrierter Salzsäure sowie einige Kubikzentimeter Chloroform und darauf eine konzentrierte Chlorkalklösung oder verdünnte Lösung von unterchlorigsaurem Natron Tropfen um Tropfen, indem man nach dem Zusatz jedes Tropfens tüchtig umschüttelt. Das Chloroform färbt sich dabei allmählich blau. Ein sehr kleiner Überschuss von Chlorkalk tut der Reaktion keinen wesentlichen Eintrag, ein grösserer bringt aber das Indigblau durch Oxydation desselben zu einem farblosen Körper wieder zum Verschwinden oder lässt es gar nicht erst zum Vorschein kommen. Wie mit unterchlorigsaurem Salz kann man die Oxydation auch durch vorsichtigen Zusatz von schwachem Chlor- oder Bromwasser vornehmen.

Eiweisshaltiger Harn ist vor der Probe vom Eiweiss zu befreien. Sehr dunkler Harn lässt sich durch Füllen mit Bleiacetat für die Probe geeigneter machen.

2. Das Chloroform bildet mit dem Harn eine sich schwer scheidende Emulsion. Obermayer<sup>2)</sup> hat deshalb das Verfahren in zweckmässiger Weise dahin abgeändert, dass er den Harn vor der Oxydation mit konzentrierter Bleizuckerlösung ausfällt. Die Oxydation wird durch Eisenchlorid vorgenommen. Das Chloroform setzt sich als klare Schicht am Boden des Glases ab.

Es muss ein Überschuss von Bleisalz vermieden werden, weil sich sonst bei dem nachfolgenden Zusatz von Salzsäure Chlorblei abscheidet, welches das Chloroform trübt. Von einer 20%igen Bleizuckerlösung braucht man ungefähr  $\frac{1}{5}$  Volumen. Das Füllen mit dem Bleisalz hat nicht bloss den Vorteil der Beseitigung der emulsionbildenden Substanz, sondern auch den, dass die Reaktion störende fremde Farbstoffe (Gallenfarbstoff) entfernt werden. Das Filtrat von dem Bleiniederschlag schüttelt man mit dem gleichen Volumen rauchender (roher) Salzsäure, in welcher auf 1 Ltr. 2—4 g Eisenchlorid aufgelöst sind, und der nötigen Menge Chloroform 1—2 Min. lang. Es tritt auch hier Indigrot auf, welches mit in das Chloroform übergeht.

Eine Überoxydation zu Isatin lässt sich auch bei Anwendung von Eisenchlorid nicht vermeiden (Ellinger<sup>3)</sup>). Durch die gleichzeitige Entstehung von Isatin erklärt sich vielleicht die Bildung des stets neben dem Indigblau auftretenden Indigrot (s. B. 5.).

Die Proben von Jaffe und Obermayer versagen im Harn nach Zusatz von Formaldehyd (Jaffe<sup>4)</sup>), wahrscheinlich weil der Aldehyd mit Indoxyl ein Kondensationsprodukt bildet.

<sup>1)</sup> M. Jaffe, Pflügers Archiv 3. 448. 1870.

<sup>2)</sup> F. Obermayer, Wiener klin. Wochenschr. 9. 176. 1890.

<sup>3)</sup> A. Ellinger, Ztschr. f. physiol. Ch. 38. 186. 1903.

<sup>4)</sup> M. Jaffe, Therapie d. Gegenwart. April 1902.



3. Ausser den genannten Mitteln sind zur Überführung der Indoxylverbindungen in Indigoblau noch eine grosse Reihe anderer vorgeschlagen worden: Salzsäure mit Wasserstoffsuperoxyd (Loubiou, Porcher und Hervieux), mit Persulfaten (Amann, Klett, Rossi), mit Kaliumchlorat (Stryzowski), Salzsäure mit Baryumsuperoxyd (Riegler), mit 2%igem Kaliumpermanganat und Schwefelkohlenstoff als Ausschüttelungsmittel (Stange), mit 1%iger Osmiumsäure (Gürber), mit Kupfersulfat (Salkowski, Imabuchi), Schwefelsäure mit Eisenchlorid (Graziani), Obermayers Reagens und nachheriger Zusatz von Schwefelsäure (Lavalle)<sup>1)</sup>.

Einen Vorzug vor den Nachweis-Methoden von Jaffe und Obermayer dürften diese Modifikationen kaum verdienen (Slowzow)<sup>2)</sup>.

4. Die blosse Zersetzung des Indicans durch konzentrierte Schwefelsäure (Heller) oder durch Salzsäure in gelinder Wärme (Stokvis) schliesst zwar die Gefahr einer zu weit gehenden Oxydation des Indicans aus, liefert aber weniger Indigfarbstoff und neben dem Indigblau auch Indigrot.

In allen diesen Fällen beweist das Auftreten der blauen Farbe allein die Anwesenheit des Indigblaus; die spektroskopische Untersuchung kann in zweifelhaften Fällen zur Bestätigung herangezogen werden. Wenn es darauf ankommt, kann man dem Chloroform beigemischtes Urobilin durch Schütteln mit verdünntem Ammoniak oder Natriumcarbonat entziehen.

Enthält der Harn Jodide, so färbt das bei der Probe freiwerdende Jod das Chloroform violett; man beseitigt dieses nach Renault durch nachträglichen Zusatz einer Lösung von unterschwefligsaurem Natron. — Nach der Verabreichung von Thymol wird der Harn nach Blum<sup>3)</sup> auf Zusatz von Salzsäure allein blaugrün; er enthält ein in Äther unlösliches, in Alkohol lösliches Chromogen, dessen alkoholische Lösung mit Salzsäure blau und darauf bei Übersättigen mit Alkali purpurrot wird.

5. Bouma empfiehlt die Abscheidung und Ausschüttelung (s. B. 5.) des Indigorot mittels Isatin-Salzsäure als Nachweis- und Bestimmungsmethode.

6. Nach Nicolas<sup>4)</sup> verbindet sich Indoxyl mit Furfurol bei Gegenwart von Säuren zu einem Kondensationsprodukt, dessen Lösungen in Chloroform, Benzol und Schwefelkohlenstoff schön grün fluoreszieren.

<sup>1)</sup> A. Loubiou, *Rev. chim. anal. appl.* **5**. 61. 1897; *Jahresber. f. Tierch.* **27**. 323. — Ch. Porcheru, Ch. Hervieux, *Ztschr. f. physiol. Ch.* **39**. 146. 1903. — P. Amann, *Rev. méd. de la Suisse rom.* 1897; *Jahresb. f. Tierch.* **28**. 309. — A. Klett, *Chemiker-Ztg.* 1900. 690. — L. Rossi, *Gaz. chim. ital.* **36**. II. 877. 1907; *Jahresb. f. Tierch.* **37**. 335. — C. Stryzowski, *Österr. Chemiker-Ztg.* **4**. 465. 1901; *Jahresb. f. Tierch.* **31**. 443. — E. Riegler, *Pharmac. Zentralhalle* **44**. 567. 1903; *Jahresb. f. Tierch.* **33**. 444. — A. Stange, *Farmaz. Westn.* 1904. 8. 294; *Jahresb. f. Tierch.* **34**. 392. — A. Gürber, *Münch. med. Woch.* **52**. 1578. 1905. — E. Salkowski, *Ztschr. f. physiol. Ch.* **57**. 520. 1909. — T. Imabuchi, *Ztschr. f. physiol. Ch.* **60**. 502. 1909. — Graziani, *Riforma medica* 1898. Nr. 181, 182; *Jahresb. f. Tierch.* **28**. 276. — F. O. Lavalle, *Chemiker-Ztg.* **30**. 1251. 1906.

<sup>2)</sup> B. Slowzow, *Russky Wratsch* 1907. 256; *Jahresb. f. Tierch.* **37**. 334.

<sup>3)</sup> L. Renault, *Chem. Zentralbl.* 1888. 500. — F. Blum, *Deutsche med. Wochenschr.* 1891. 186.

<sup>4)</sup> E. Nicolas, *Compt. rend. Soc. Biol.* **58**. I. 183. 1906.

Man kann dem Harn direkt das gleiche Volum einer konzentrierten Salzsäure zusetzen, die ganz geringe Mengen Furfurol enthält, der Harn nimmt dann eine mehr oder weniger tiefgelbe Färbung an und beim Umschwenken mit Schwefelkohlenstoff nimmt dieser die grüne Fluoreszenz an.

Die Reaktion vollzieht sich schnell und in der Kälte, sie soll nach ihrem Autor ganz eindeutig sein.

#### E. Bestimmungsmethoden.

Die im folgenden zu beschreibenden Methoden beruhen alle auf einer Überführung des aus dem Harn durch Salzsäure freigemachten Indoxyls in Indigo. Entweder wird durch Zusatz eines Oxydationsmittels (Eisenchlorid, Kupfersulfat) im wesentlichen Indigoblau oder durch Erwärmen mit Isatin-Salzsäure Indigorot gebildet. Der Farbstoff wird mit Chloroform ausgeschüttelt, die Chloroformlösung oder der daraus gewonnene Rückstand einer Reinigung unterzogen, über deren zweckmässigste Gestaltung viel diskutiert worden ist (Wang, Bouma, Ellinger, Maillard), und der Farbstoffgehalt der Chloroformlösung wird entweder kolorimetrisch bzw. spektrophotometrisch bestimmt, oder der gebildete Indigo wird durch Auflösen in konzentrierter Schwefelsäure in Sulfosäure übergeführt und mit Kaliumpermanganat titrimetrisch bestimmt. Der Rückstand der gereinigten Chloroformlösung kann natürlich auch durch Wägung bestimmt werden.

Das von F. Mohr zur Wertbestimmung des Indigos in der Technik zuerst verwandte Titrationsverfahren ist von Wang in die Harnchemie eingeführt worden und von Ellinger an reinen Lösungen von indoxylschwefelsaurem Kalium auf seine Fehlergrenzen geprüft worden. Bei Anwendung des unten beschriebenen Reinigungsverfahrens, das wie in besonderen, nicht veröffentlichten Versuchen festgestellt wurde, mit dem gleichen Resultate durch das Maillardsche ersetzt werden kann, ergab sich ein Verlust von 15% im Durchschnitt. Dieser Verlust beruht jedenfalls zum erheblichen Teil auf der Überoxydation von Indoxyl bis zu Isatin, dessen Bildung nachgewiesen werden konnte. Ein Teil des gebildeten Isatins wird wahrscheinlich zur Bildung von Indigorot benutzt, das bei der Oxydation nach Obermayer stets neben Indigoblau gefunden wird. Ob andere Oxydationsmittel die Überoxydation verringern oder ausschliessen, ist nicht geprüft. Der Fehler der Überoxydation kommt natürlich gleichermassen in Betracht, ob man den Indigo titrimetrisch, mit der Wage oder einer optischen Methode bestimmt.

Die Bestimmung als Indigorot nach Bouma gibt höhere Werte, leidet aber an der Unsicherheit, dass sie nicht mit reinen indoxylschwefelsauren Salzlösungen geprüft ist. Die kolorimetrische Bestimmung als Indigorot nach Bouma kann als Schätzungsmethode für klinische Zwecke gute Dienste leisten, wenn der Farbenton der aus dem Harn gewonnenen Indigorotlösung hinreichend rein ist, um einen sicheren Vergleich mit den Standardröhrchen zu gestatten. Dies ist aber infolge der öfter auftretenden blauvioletten Töne nicht immer der Fall.

Da man weder bei der Überführung in Indigoblau noch bei der in Indigorot die Garantie hat, einen einheitlichen Farbstoff zu erhalten, so sind die optischen Methoden unsicher.

### 1. Titrimetrische Bestimmung des Indigoblau.

#### A. Erfordernisse.

1. Bleiessig (Liquor plumbi subacetici).
2. Obermayers Reagens, d. i. reine Salzsäure, vom spez. Gew. 1,19, die im Liter 2—4 g festes Eisenchlorid enthält.
3. Reine konzentrierte Schwefelsäure, die Kaliumpermanganat nicht entfärben darf.
4. Chloroform.
5. 0,1%ige Natronlauge.
6. Eine annähernd  $n/20$ -Kaliumpermanganat-Stammlösung (ca. 3 g in 1 Liter). Von der Stammlösung werden 5 ccm mit Wasser auf 200 ccm verdünnt. Der Titer dieser Lösung wird auf reinen käuflichen Indigo eingestellt; 1 ccm entspricht etwa 0,15 mg Indigo.

**Ausführung.** Der sauer reagierende oder mit Essigsäure schwach angesäuerte Harn (bei einem spez. Gewicht über 1040 nach Verdünnung mit dem gleichen Volum Wasser) wird mit  $1/10$  Volum Bleiessig gefällt und filtriert. Vom Filtrat wird ein je nach dem Ausfall der qualitativen Probe variierendes Volum abgemessen. Zumeist werden 100 oder 50 ccm zur Bestimmung verwandt. Als Kriterium für die zu wählende Menge gelte, dass 3—4 Ausschüttelungen des mit dem gleichen Volumen Obermayers Reagens versetzten Harnfiltrats mit je etwa 30 ccm Chloroform von 2 Minuten Dauer genügen, um allen Indigo in Lösung zu bringen. Die Ausschüttelungen werden in einem Scheidetrichter so lange fortgesetzt, bis das Chloroform sich nicht mehr färbt.

Man vereinigt die abgelassenen Chloroformlösungen in einem zweiten Schütteltrichter, und lässt sie darin einige Minuten stehen,

damit mitgerissene Harntropfchen sich abscheiden bzw. an dem Glase haften bleiben (Imabuchi), filtriert die Chloroformauszüge durch ein kleines trockenes Filter, das mit Chloroform sorgfältig nachzuwaschen ist, in einen trockenen, sorgfältig gereinigten Kolben.

Die Reinigung der Chloroformauszüge kann auf zwei Weisen ausgeführt werden:

a) Man destilliert das Chloroform auf dem Wasserbad ab und trocknet den Rückstand noch etwa 5 Minuten auf dem Wasserbad im liegenden Kolben. Der Rückstand wird 3—4 mal mit heissem Wasser ausgewaschen, indem man jedesmal ca. 30 ccm Wasser der Wand entlang eingiesst, leicht umschwenkt, einige Minuten stehen lässt und das Wasser abgiesst. Das letzte Waschwasser soll Kaliumpermanganatlösung nicht entfärben (Ellinger, Imabuchi). Sollte bei dem Waschen eine Loslösung von Indigopartikelchen erfolgt sein, was bei richtiger Ausführung der Waschung nur sehr selten vorkommt, so muss das Waschwasser durch ein kleines Filterchen filtriert und der Filterrückstand nach Trocknen des Filters mit Chloroform extrahiert werden. Der Rückstand eines solchen zweiten Chloroformauszugs wird dann ohne nochmaliges Waschen in konzentrierter Schwefelsäure gelöst und mit der Hauptmenge vereinigt.

b) Die vereinigten Chloroformausschüttelungen werden in einem Scheidetrichter zunächst mit Wasser, dann mit 1%iger Natronlauge, dann wieder mit Wasser gewaschen (Maillard). Da salzsäurehaltiges Chloroform mehr Indigo löst als reines, so kann bei diesen Waschungen durch Entziehung der Salzsäure sich aus konzentrierten Lösungen etwas Indigo abscheiden, der dann schwer aus dem Schütteltrichter quantitativ zu entfernen ist. Man fügt deshalb zu stark gefärbten Chloroformlösungen vor dem Waschen noch reichlich Chloroform hinzu, so dass die Abscheidung vermieden wird. Die so gereinigte Chloroformlösung wird wie bei a) filtriert, abdestilliert, getrocknet und dann nicht mehr gewaschen.

Der Indigo im Kolben wird mit 10 ccm reiner konzentrierter Schwefelsäure aufgenommen und zur vollständigen Lösung 5—10 Min. auf dem kochenden Wasserbad erwärmt. Die Schwefelsäurelösung wird in einen sorgfältig gereinigten Erlenmeyer-Kolben gegossen, in dem sich 100 ccm destilliertes Wasser befinden und mit destilliertem Wasser in den Kolben nachgespült. Die blaue Lösung ist fast stets vollständig klar, eine geringe Trübung erschwert das Erkennen des Endpunkts der Titration, macht die Bestimmung aber nicht unmöglich.

Die heisse Lösung der Sulfosäure wird mit der  $n/400$ -Kaliumpermanganatlösung titriert. Da neben dem Indigoblau stets Indigorot



zugegen ist, so wird die Flüssigkeit nach Verschwinden des grünen Farbentons zunächst rot. Als Endpunkt der Titration gilt der Umschlag des rötlichen Farbentons in reines Gelb.

Zu der aus dem Kaliumpermanganatverbrauch ermittelten Indigomenge ist noch  $\frac{1}{6}$  des Wertes zu addieren mit Rücksicht auf die von Ellinger ermittelten Verluste.

#### Modifikation von Imabuchi<sup>1)</sup>.

50 ccm Harnfiltrat werden mit 1—2 ccm 10%iger Kupfersulfatlösung und 50 ccm Salzsäure ( $D = 1,19$ ) statt mit Obermayers Reagens versetzt. Die Ausschüttelung erfolgt erst nach 5—10 Minuten. Im übrigen wird wie oben verfahren. Die Waschung führt Imabuchi nach der Vorschrift von Ellinger (a) aus. Die Schwefelsäurelösung wird nach dem Erkalten mit 100 ccm Wasser verdünnt und titriert.

Vergleichsbestimmungen mit der älteren Methode ergeben, dass nach Imabuchi 2—5 % Indigo mehr gefunden werden.

#### 2. Wägung des Indigoblaus.

Die ältesten quantitativen Indigobestimmungen sind von Jaffe<sup>2)</sup> durch Wägung des Niederschlags ausgeführt, der in einer wässrigen Lösung des gereinigten alkoholischen Harnextrakts mit Salzsäure und aus der optimalen Menge Chlorkalklösung erhalten wurde. Der Niederschlag wurde auf ein gewogenes Filter gebracht, nacheinander mit kaltem und heissem Wasser, mit verdünntem heissem Ammoniak und schliesslich nochmals mit Wasser gewaschen, bei 105—110° getrocknet und gewogen.

Statt dieser mit mancherlei Fehlern behafteten Methode dürfte es sich mehr empfehlen, den Rückstand der Chloroformlösung, der nach Methode 1 titriert wird, nach der Reinigung zu wägen, wobei dann grössere Mengen Harnfiltrat verarbeitet werden müssen, damit die Wägefehler nicht zu sehr ins Gewicht fallen.

#### 3. Kolorimetrische Bestimmung des Indigoblaus.

Von verschiedenen Autoren (Salkowski, Krauss, Adrian, Strauss)<sup>3)</sup> sind kolorimetrische Verfahren angewendet worden. Die

<sup>1)</sup> T. Imabuchi, Ztschr. f. physiol. Ch. 60. 502. 1909.

<sup>2)</sup> M. Jaffe, Pflügers Archiv 3. 448. 1870.

<sup>3)</sup> E. Salkowski, Virchows Arch. 68. 407. 1876. — E. Krauss, Ztschr. f. physiol. Ch. 18. 172. 1893. — C. Adrian, ebenda 19. 126. 1894. — H. Strauss, Deutsche med. Wochenschr. 1902. 299.

Farbe der Chloroformlösungen wird entweder mit der von Indigolösungen bekannten Gehalts, die man in zugeschmolzenen Röhren einige Zeit aufbewahren kann, ohne dass sie ihre Farbe verändern, verglichen, oder die erhaltenen Chloroformlösungen werden so lange mit abgemessenen Mengen Chloroform verdünnt, bis ihre Farbe gleich der einer Vergleichslösung von bestimmtem Gehalt geworden ist.

Bauer<sup>1)</sup> hat eine Farbentafel entworfen, deren einzelne Farben verschiedenen konzentrierten Chloroformlösungen von Indigoblau entsprechen. Mit den Farben der Tafel werden die der Chloroformausschüttelungen des Pferdeharns verglichen. Für den indicanreichen Pferdeharn soll das Verfahren eine klinisch brauchbare Schätzung ermöglichen.

Zu annähernden Bestimmungen für klinische Zwecke sind die kolorimetrischen Methoden brauchbar. Sie leiden aber an dem Übelstande, dass die Chloroformlösungen aus dem Harn stets Indigorot neben dem Blau enthalten und dadurch der Vergleich mit reinen Indigoblaulösungen erschwert wird. Am besten lassen sich die kolorimetrischen Vergleiche mit solchen Chloroformlösungen anstellen, die nicht eingengt und die nach Maillard gewaschen sind. Denn beim Eindampfen der noch säurehaltigen Chloroformlösungen nimmt die Rotfärbung zu. Für die Gründe dieser Farbenänderung vgl. die Arbeiten von Bouma, Maillard und Ellinger.

#### 4. Spektrophotometrische Bestimmung des Indigoblaus nach F. Müller<sup>2)</sup>.

Die Chloroformauszüge werden auf ein rundes Volumen gebracht und ihr Gehalt an Indigo spektrophotometrisch bestimmt (s. S. 48 ff.). Der sensible Spektralbezirk liegt in C 52 D — C 95 D. Zur Berechnung der Konzentration (Gramm Substanz im Kubikzentimeter) nach  $c = A \epsilon$  ist die Kenntnis des Absorptionsverhältnisses, der Konstanten A, erforderlich. Diese bestimmte Müller mit ganz reinem krystallinischem Indigo zu 0,000 194.

Gegen die spektrophotometrische Methode gelten die gleichen Einwände wie gegen die kolorimetrischen Bestimmungen.

#### 5. Titration des Indigrots (Bouma)<sup>3)</sup>.

##### A. Erfordernisse.

1. Bleiessig.
2. Lösung von 20 mg Isatin in 1 Liter reiner konzentrierter Salzsäure vom spez. Gew. 1.19 (jeden Monat frisch zu bereiten).

<sup>1)</sup> E. Bauer, Nachweis und Bedeutung des Indicans im Pferdeharn. Inaug.-Diss. Giessen 1905.

<sup>2)</sup> F. Müller, Mitteilungen aus der med. Klinik zu Würzburg. 2. 344. 1886.

<sup>3)</sup> J. Bouma, Ztschr. f. physiol. Ch. 32. 82. 1901.

## 3. Chloroform.

## 4. Reine konzentrierte Schwefelsäure.

5. Kaliumpermanganat-Lösung, die nicht verdünnter als 1:20000 sein darf. Sie wird auf reines, synthetisches Indigorot der Badischen Anilin- und Sodafabrik eingestellt; 1 ccm soll etwa 0,2 mg Indigo entsprechen.

B. Ausführung. Der Harn wird mit Bleiessig (1 Vol. auf 10 Vol. Harn) gefällt, ein Teil des klaren Filtrats (etwa 40 ccm, entsprechend 400 Harn) mit dem gleichen Volum Isatin-Salzsäure versetzt und auf dem kochenden Wasserbade eine Viertelstunde erhitzt; das Gemisch färbt sich dabei gewöhnlich dunkelrot. Indicanreiche Urine, d. h. solche, die beim Kochen von 5 ccm Harn mit 5 ccm Reagens und Ausschütteln mit 2 ccm Chloroform dieses dunkelweinrot färben, werden zur Bestimmung mit Wasser verdünnt.

Nach dem Erhitzen wird die Flüssigkeit abgekühlt, im Scheidetrichter mit Chloroform ausgeschüttelt und das Chloroform in eine Schale abgelassen. Man lässt die Chloroformlösung einige Minuten ruhig stehen, damit beigemengte Harntropfchen sich an der Schalenwand absetzen, giesst vorsichtig in eine andere Schale ab, verdunstet das Chloroform, trocknet den Rückstand 2 Stunden bei 110° und extrahiert ihn zur Entfernung des überschüssigen Isatins mit heissem Wasser, bis die abgegossene Flüssigkeit nicht mehr reduziert. Der gereinigte Rückstand wird in konzentrierter Schwefelsäure gelöst, mit Wasser verdünnt und mit der Permanganatlösung bis zum Umschlag der roten Farbe in Gelb titriert.

Die Sulfosäurelösung muss ganz klar sein; ist sie getrübt, so filtriert man durch ein kleines, trockenes Filter und titriert einen aliquoten Teil des Filtrats. Die zuerst durchfiltrierten 20–30 ccm bleiben unbenutzt, weil zunächst vom Filter etwas Indigo zurückgehalten wird. Es empfiehlt sich während der Titration dann und wann ein wenig starke Schwefelsäure zuzugeben, um die Abscheidung von Mangansuperoxyd zu vermeiden.

Ein Molekül Indoxyl liefert bei diesem Verfahren mit einem Molekül Isatin 1 Molekül Indigorot, während bei den Bestimmungen als Indigoblau 2 Moleküle Indoxyl 1 Molekül Indigo bilden.

Die Methode liefert nach Bouma<sup>1)</sup> ungefähr um 10 % höhere Werte als die unter 1. beschriebene.

## 6. Kolorimetrische Bestimmung des Indigrots.

Zur annähernden Bestimmung des Indoxyls für klinische Zwecke hat Bouma<sup>1)</sup> ein „Indicanurometer“ zusammengestellt, welches aus 11 in einer Reihe geordneten Reagenzröhrchen von gleichem Durchmesser und gleicher Wanddicke besteht. Sechs dieser Röhrchen enthalten eine Lösung von aus Harn bereitetem Indigorot

<sup>1)</sup> J. Bouma, Ztschr. f. physiol. Ch. 39. 372. 1903.

in Chloroform oder absolutem Alkohol von verschiedener Stärke, die der Reihe nach übereinstimmt mit einem Gehalt des Harns an Indigo von 5, 10, 15, 20, 30, 40 mg per Liter. Die Röhrchen wurden nach der Füllung zugeschmolzen. Im Gestell des Apparates ist zwischen je 2 Standardröhrchen Raum offen gelassen für das Hinstellen eines Proberöhrchens, um die Farbenvergleiche zu erleichtern. Die Proberöhrchen haben eine Marke bei  $5\frac{1}{2}$ ,  $15\frac{1}{2}$  und  $20\frac{1}{2}$  ccm. Der Apparat ist vor Licht geschützt aufzubewahren.

Man fällt 20 ccm Harn mit 2 ccm Bleiessig, filtriert durch ein trockenes Filter, giesst  $5\frac{1}{2}$  ccm (entsprechend 5 ccm Harn) des Filtrats in ein Proberöhrchen und fügt 10 ccm Isatinsalzsäure zu. Bei indicanreichen Harnen verdünnt man vorher mit einem abgemessenen Quantum Wasser. Man erhitzt bis zum Sieden, kocht einige Sekunden lang, kühlt ab und schüttelt mit 5 ccm Chloroform aus. Die Chloroformlösung wird zwischen die Standardröhrchen einrangiirt, mit denen sie in der Farbe am besten übereinstimmt.

Bei Anwesenheit oxydierender Substanzen erhält man nach Bouma<sup>1)</sup> beim Kochen des Harns mit Isatinsalzsäure eine zur Kolorimetrie ungeeignete Mischung von Indigoblau mit Indigorot. In solchen Fällen empfiehlt er durch das Harnfiltrat  $\frac{1}{4}$  Stunde lang Schwefelwasserstoff langsam durchzuleiten, vom Bleisulfid durch ein trockenes Filter zu filtrieren und das Filtrat in der angegebenen Weise zu prüfen.

Nach meinen Erfahrungen gelingt es öfter auch nach diesem Verfahren nicht, vergleichbare Farbentöne zu erhalten. In vielen Fällen erwies sich dagegen die Boumasche Methode für klinische Bestimmungen brauchbar.

Oerum<sup>2)</sup> empfiehlt das nach Bouma gewonnene Indigorot in dem in der Zeitschrift für analytische Chemie Bd. 43, S. 178 beschriebenen Meislingschen Kolorimeter zu bestimmen.

## 7. Kolorimetrische Bestimmung nach Montfet<sup>3)</sup>.

A. Prinzip: Das aus dem Indoxyl durch Oxydation entstandene Indigoblau wird durch Erhitzen mit Salpetersäure oxydiert, indem sukzessive Isatin, Nitrosalicylsäure und Pikrinsäure entsteht. Diese wird als Kaliumpikrat kolorimetrisch bestimmt.

B. Ausführung: 100 ccm Urin werden mit 100 ccm Salzsäure und 50 ccm Wasserstoffsuperoxydlösung auf  $50^{\circ}$  erhitzt und mit je 40—50 ccm Chloroform vorsichtig, um Emulsionsbildung zu vermeiden, erschöpfend ausgeschüttelt. Das Chloroform wird abgedampft, und der Rückstand mit 50 ccm Wasser und 5 ccm Salpetersäure 5 Min. bis annähernd zum Sieden erhitzt. Nach dem Abkühlen macht man mit konzentrierter Kaliumcarbonatlösung alkalisch, füllt mit Wasser auf 100 ccm auf und bestimmt das Kaliumpikrat kolorimetrisch nach Montfet<sup>4)</sup>, indem man die Lösung mit Kaliumpikratlösungen, die aus einer bestimmten Menge Phenol bereitet sind, vergleicht. Die Umrechnung auf Indigo erfolgt, indem man den Phenolwert mit 1,4 multipliziert.

Kontrollbestimmungen sind in der kurzen Veröffentlichung von Montfet nicht mitgeteilt.

<sup>1)</sup> J. Bouma, Deutsche med. Wochenschr. 28. 705. 1902.

<sup>2)</sup> H. P. T. Oerum, Ztschr. f. physiol. Ch. 45. 459. 1905.

<sup>3)</sup> L. Montfet, Compt. rend. Soc. Biol. 55. 1251. 1902.

<sup>4)</sup> L. Montfet, Compt. rend. Acad. d. scienc. 137. 386. 1903.



### Umwandlungsprodukte des Skatols.

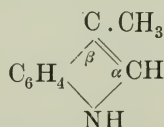
Nach der Einverleibung von Skatol, wie sie von Brieger vorgenommen worden ist, soll bei Hunden, Kaninchen und Fröschen eine Ätherschwefelsäure auftreten, welche sich ganz ähnlich wie die Indoxylschwefelsäure verhält, von ihr aber verschieden ist und die deshalb, wiewohl ihre Zusammensetzung nicht bekannt ist, als Skatoxylschwefelsäure bezeichnet wurde. In ähnlichen Versuchen sah Mester<sup>1)</sup> zwar anfangs auch viel Ätherschwefelsäure auftreten, später aber ein anderes Skatolderivat, vielleicht Skatoxylglycuronsäure. Auch spätere Beobachter (Grosser, Staal, s. Skatolrot) kamen hinsichtlich der Vermehrung der Ätherschwefelsäuren nach Skatolgaben nicht zu klaren Resultaten.

Ob im normalen Harn Skatolderivate vorkommen, ist zweifelhaft, wiewohl das Skatol einen konstanten Bestandteil der menschlichen Fäces bildet. Denn das einzige Anzeichen hierfür, das Auftreten eines sonst nicht näher charakterisierten roten Farbstoffs bei der Anstellung der Indicanprobe, kann auch auf die Bildung von Indigrot bezogen werden.

Aus dem Harn eines an Verdauungsstörungen leidenden Diabetischen hat Otto<sup>2)</sup> nach dem Baumann-Briegerschen Verfahren zur Darstellung des indoxylschwefelsauren Kalis ein in zusammenhängenden, kleinen Knollen krystallisierendes Salz dargestellt, das er als skatoxylschwefelsaures Kali ansprach, weil das Resultat einer Schwefelsäure- und zweier Stickstoffbestimmungen auf die angenommene Verbindung stimmte.

Die Charakterisierung der Substanz durch Otto genügt indessen nicht zum Beweise, dass es sich um skatoxylschwefelsaures Kali handelt. Er gibt nur an, dass die Krystalle bei trockenem Erhitzen rote Dämpfe entwickelten und das Residuum mit Chlorbaryum Baryumsulfat gab, dass ihre wässrige Lösung sich mit konzentrierter Salzsäure rot, mit Eisenchlorid violett und mit Salpetersäure rot färbte.

Übrigens hat schon Mester darauf hingewiesen, dass, wenn eine Skatoxylschwefelsäure existiert, sie nicht vollkommen analog der Indoxylschwefelsäure zusammengesetzt sein kann. Da dem Skatol die Formel



<sup>1)</sup> L. Brieger, Ber. d. chem. Gesellsch. **10**. 1031. 1877; **12**. 1985. 1879; Ztschr. f. physiol. Ch. **4**. 416. — B. Mester, Ztschr. f. physiol. Ch. **12**. 130. 1888.

<sup>2)</sup> Jac. G. Otto, Pflügers Archiv **33**. 615. 1884.

zukommt, so müsste die Oxydation entweder am  $\alpha$ -Kohlenstoff-Atom des Pyrrolrings oder an der Methylgruppe eingetreten sein, während im Indoxyl die Hydroxylgruppe sich am  $\beta$ -Kohlenstoff-Atom des Pyrrolrings befindet.

Weiteres über Skatolumwandlungsprodukte s. bei Skatolrot im Kap. „Farbstoffe“.

## Säuren.

### Benzoessäure.



A. Vorkommen. Die Benzoessäure ist von Bedeutung als Muttersubstanz und Zersetzungsprodukt der Hippursäure. Namentlich in alkalischem und eiweisshaltigem Urin tritt ausserordentlich leicht ein Zerfall der Hippursäure in Benzoessäure und Glycocoll ein, die nach van de Velde und Stockvis wohl zum Teil durch nicht organisierte Fermente bewirkt wird. Bei Anwesenheit von bestimmten Bakterien, namentlich Staphylokokken, kann die Zersetzung quantitativ sehr weit gehen (Seo)<sup>1)</sup>.

Ob im normalen Harn ohne vorausgegangenen Genuss von Benzoesäure oder solchen Substanzen, die im Organismus in Benzoessäure übergehen (s. das Kap. „Körperfremde Stoffe“), die Säure ungepaart ausgeschieden wird, ist noch nicht ganz sicher. Nach Seo findet sich im frischen, sterilen Menschenharn, nach Riecke im Harn des Hammels und nach Steenbock im Kuhharn keine freie Benzoessäure, dagegen fand Wiechowski selbst im sauren Harn von Kaninchen stets einige mg freie Benzoessäure. Doch fehlen Angaben darüber, ob der untersuchte Harn steril und so eine sekundäre Entstehung ausgeschlossen war. Die Verschiedenheit der Befunde erklärt sich zum Teil vielleicht auch daraus, dass Hippursäure bei längerem Erhitzen auf dem Wasserbade in schwach alkalischer, selbst sodaalkalischer Lösung teilweise hydrolysiert wird (Folin und Flanders<sup>2)</sup>).

B. Eigenschaften. 1. Die sublimierte Benzoessäure erscheint in farblosen, glänzenden, feinen Nadeln und Plättchen, die aus ihren Salzen durch Säure abgeschiedene dagegen in Schuppen, schmalen Säulen oder sechsseitigen Nadeln, deren Grundform ein gerades rhombisches Prisma ist. Beim Erkalten wässriger Lösungen erscheinen die Krystalle immer als aneinander gereihte, auch wohl übereinander liegende Tafeln von genau 90°; in seltenen Fällen findet sich ein Winkel abgestutzt; häufig erscheinen die Ränder wie angenagt.

<sup>1)</sup> A. van de Velde u. B. Stockvis, Arch. f. exper. Path. u. Pharm. **17**. 189. 1893. — Y. Seo, ebenda. **58**. 440. 1908.

<sup>2)</sup> R. Riecke, Über die Bildung der Hippursäure im tierischen Organismus. Inaug.-Diss. Breslau (phil. Fak.). Wolfenbüttel 1903. — H. Steenbock, Journ. of biolog. chem. **11**. 201. 1912. — W. Wiechowski, Hofmeisters Beiträge **7**. 204. 1905. — O. Folin und F. F. Flanders, Journ. of biol. chem. **11**. 257 1912.

2. Sie sublimiert bei 100°, schmilzt bei 121,4° und siedet bei 249° unzersetzt, ihre Dämpfe kondensieren sich und reizen zum Husten. In kaltem Wasser ist sie schwer (1 Tl. in 370 Tln.), leichter (in 10 facher Menge) in heissem löslich; Alkohol, Äthyläther, Essigäther, Benzol, Chloroform nehmen sie leicht auf, Petroläther aber schlecht; nach Stellwag<sup>1)</sup> löst sie sich in 7 Teilen Äthyläther und in ungefähr 1000 Teilen Petroläther. Ihre Lösungen röten Lackmus. Sie verflüchtigt sich mit Wasserdämpfen.

3. Die Benzoesäure ist einbasisch. Ihre Salze sind meistens in Wasser löslich, das Silber-, Blei- und Quecksilbersalz sind schwer löslich. Die benzoesauren Alkalien lösen sich auch in Alkohol. — Säuren fällen aus den Benzoaten die Benzoësäure in glänzenden, weissen Schuppen.

4. Eisenchlorid erzeugt in der Lösung der benzoesauren Salze einen bräunlich gelben Niederschlag von benzoesaurem Eisenoxyd, der durch Ammoniak unter Abscheidung von Eisenhydroxyd und benzoesaurem Ammon, durch Salzsäure unter Abscheidung von Benzoesäure und Eisenchlorid zersetzt wird.

5. Erhitzt man Spuren von Benzoesäure mit einigen Tropfen absoluten Alkohols und einem Tropfen konzentrierter Schwefelsäure, so tritt der charakteristische, aromatische Geruch des Benzoesäure-Äthylesters auf, der namentlich nach Zusatz von Wasser und nochmaligem Erhitzen deutlich wird.

6. In einer klaren Mischung von Weingeist, Chlorbaryumlösung und Ammoniak bewirkt weder Benzoesäure noch benzoesaures Salz einen Niederschlag (Unterschied von Bernsteinsäure).

7. Verdampft man Benzoesäure mit etwas Salpetersäure kochend in einer kleinen Schale, so entwickelt sich, sobald man den Rückstand stärker erhitzt, der Geruch nach Bittermandelöl (Nitrobenzol).

8. Beim Kochen mit alkalischer Natriumhypobromitlösung gibt sie im Gegensatz zur Hippursäure keinen kermesfarbenen Niederschlag (Denigès)<sup>2)</sup>.

C. Nachweis und Darstellung. Die Benzoesäure wird aus dem Harn nach denselben Methoden abgeschieden, wie die Hippursäure (s. diese); sie findet sich dann entweder allein oder neben dieser vor, und wird von der Hippursäure durch Petroläther getrennt, in welchem sich die Benzoesäure löst, die Hippursäure dagegen nicht. Beim Verdunsten des Petroläthers bleibt die Benzoesäure krystallinisch zurück. Der Petroläther muss frisch destilliert sein, weil die Benzoesäure sonst leicht stark gefärbt erhalten wird (Th. Weyl u. B. v. Anrep). — Um die flüchtige Benzoesäure nicht zu verlieren, lässt man ihre Lösungen bei Zimmertemperatur verdunsten. Ausserordentlich beschleunigt wird die Verdunstung, wenn man nach G. Vulpinus den kurzen Schenkel eines Hebers dem Spiegel der Flüssigkeit bis auf 1 cm nähert und den langen Schenkel ansaugt; der kurze Schenkel soll nicht länger sein, als das Gefäss tief ist.

Nach Dakin<sup>3)</sup> extrahiert man den frischen, mit Phosphorsäure stark angesäuerten Urin in einem Extraktionsapparat erschöpfend mit Benzol, schüttelt den Benzolextrakt kräftig mit einer kleinen Menge wässriger Natronlauge, die die Benzoesäure aufnimmt. Ist viel Benzoesäure vorhanden, so fällt sie aus der alkalischen Lösung beim Ansäuern sofort aus. Entsteht kein Niederschlag, so schüttelt man die angesäuerte Lösung mit Äther aus, verdunstet den Äther und prüft den Rückstand auf Benzoesäure. —

Von etwa gleichzeitig vorhandener Bernsteinsäure trennt man die Benzoesäure dadurch, dass man beide Säuren in ihre Barytsalze verwandelt und diese mit siedendem Alkohol behandelt, in welchem sich das benzoesaure Salz löst. Aus dem Barytsalz lässt sich die Benzoesäure leicht durch Salzsäure abscheiden.

Man erkennt die Benzoesäure an ihrer Krystallform und ihrem Verhalten bei der trockenen Destillation (im Reagenzglas), wodurch sie sich von der Hippursäure scharf unterscheidet (B. 1 u. 2). Die Bildung von Nitrobenzol (B. 7) und die Esterifizierung (B. 5) dienen zur Bestätigung.

<sup>1)</sup> A. Stellwag, Landwirtsch. Versuchsstationen **37**. 136. 1890.

<sup>2)</sup> G. Denigès, Comptes rendus **107**. 662.

<sup>3)</sup> H. D. Dakin, Journ. of biol. chem. **7**. 107. 1909.



D. Bestimmung der im Harn präformierten Benzoesäure s. bei Bestimmung der Hippursäure. S. 828 ff.

### Hippursäure.



Syn. Benzoylglycocoll.

Synthetisch erhält man Hippursäure leicht nach Baum<sup>1)</sup> wie folgt. Man löst Glycocoll in wenig Wasser, fügt einige Tropfen Natronlauge zu und schüttelt mit Benzoylchlorid, das allmählich im Überschuss zugesetzt wird. Schliesslich macht man mit Natronlauge stark alkalisch. Durch Ansäuern mit Salzsäure erhält man ein Gemisch von Hippursäure und Benzoesäure, das nach den unten beschriebenen Methoden getrennt werden kann.

A. Vorkommen. Im menschlichen Harn kommen etwa 0,1 bis 2 g Hippursäure in der Tagesmenge vor (Lewin)<sup>2)</sup>. Bei Pflanzenfressern ist sie oft der in grösster Menge vorkommende stickstoffhaltige Harnbestandteil. In 1 Liter Kuhharn finden sich je nach der Fütterung Mengen von 4—27 g.

Auch bei reiner Fleischkost und im Hunger fehlt sie nicht im Harn; beim Fleischfresser ist die Hippursäurebildung nach Baumann ausschliesslich abhängig von der Eiweissfäulnis im Darm, da die hierbei entstehende Phenylpropionsäure als Hippursäure im Harn erscheint (E. u. H. Salkowski). Von Henneberg veranlasste ausgedehnte Fütterungsversuche haben aber ergeben, dass bei Wiederkäuern die Hippursäureausscheidung zur Menge des verdauten Eiweisses in keinem Verhältnis steht. Die Untersuchungen von Meissner und Shepard u. a. lehren vielmehr, dass ein Bestandteil der Rohfaser an der Bildung der Hippursäure beteiligt ist und Götze und Pfeiffer<sup>3)</sup> haben gezeigt, dass beim Hammel die Beifütterung von Gummi die Menge der Hippursäure, entsprechend der Menge des Beifutters, um etwas erhöht.

Welche Substanzen in der Rohfaser die Quelle der Hippursäure sind, ist noch nicht völlig klargestellt. O. Loew hielt dafür die Chinasäure  $\text{C}_6\text{H}_4 \cdot \text{H}_6(\text{OH})_4 \cdot \text{COOH}$ , die vom Pflanzenfresser und vom Menschen, nicht aber vom Hunde als Hippursäure ausgeschieden wird (Stadelmann, Hupfer<sup>4)</sup>). Riecke zeigte, dass aus der Rohfaser des Heues eine wasserlösliche Substanz zu erhalten ist, die bei Oxydation mit Kaliumpermanganat in alkalischer Lösung annähernd das Quantum Benzoesäure liefert, das der bei Verfütterung des Ausgangsmaterials an Hammel ausgeschiedenen Menge Hippursäure entspricht. Die Hippursäurevermehrung nach Zugabe von Kirschgummi (s. o.) ist wahrscheinlich auch auf die im Gummi enthaltenen Benzoesäure liefernden Substanzen und nicht auf Pentosane zu beziehen. Unter den

<sup>1)</sup> J. Baum, Ztschr. f. physiol. Ch. **9**. 465. 1885.

<sup>2)</sup> K. Lewin, Ztschr. f. klin. Med. **42**. 371. 1901.

<sup>3)</sup> E. Baumann, Ztschr. f. physiol. Ch. **10**. 131. 1886. — E. u. H. Salkowski, ebenda **7**. 168. 1882/83. — K. Götze u. Th. Pfeiffer, Landwirtsch. Versuchsstationen **47**. 80. 1896.

<sup>4)</sup> O. Loew, Journ. f. prakt. Ch. **127**. 309. **128**. 476. 1879. — E. Stadelmann, Arch. f. exper. Path. u. Pharmak. **10**. 317. 1879. — F. Hupfer, Ztschr. f. physiol. Ch. **37**. 302. 1903.



Muttersubstanzen der Hippursäure aus der Rohfaser spielt vielleicht das Coniferin eine Rolle (Riecke).

Von wesentlicher Bedeutung scheint nach Haralamb Vasilu<sup>1)</sup> bei den Pflanzenfressern auch der Phenylalaninkomplex der Eiweisskörper zu sein. Beim Menschen bewirkt Eingabe von Phenylalanin keine Hippursäure-Ausscheidung. Dagegen erscheint danach beim Hammel fast die Hälfte der theoretisch möglichen Menge Hippursäure im Harn. Inwieweit die Darmfäulnis und die intermediäre Entstehung von Phenylpropionsäure bei diesen Beobachtungen von Bedeutung ist, muss noch klargestellt werden.

Beim Menschen kommt für eine Vermehrung der Hippursäure-Ausscheidung hauptsächlich die Darmfäulnis — Lewin fand bei Perityphlitis über 2 g — und der Genuss von Obst, namentlich von Beeren in Betracht. Nach Jaarsveld und Stockvis soll bei parenchymatöser Nephritis und Amyloidniere die Fähigkeit der Niere Hippursäure synthetisch zu bilden vermindert sein, nach Sertoli und Lewinski<sup>2)</sup> gilt das jedenfalls nicht allgemein, dagegen soll sowohl bei Schrumpfnieren wie bei parenchymatöser Nephritis die Ausscheidung verlangsamt sein.

Bei Hühnern wird Benzoessäure als Ornithursäure ausgeschieden (s. Kap. „Körperfremde Stoffe“).

B. Eigenschaften. 1. Die Hippursäure bildet milchweisse, halbdurchsichtige, vierseitige Prismen und Säulen, die an den Enden in zwei oder vier Flächen auslaufen und häufig zu Drusen vereinigt sind. Die Grundform ist immer ein vertikales rhombisches Prisma (Taf. I, Fig. 3 rechte obere Hälfte). Einzelne Formen haben zuweilen Ähnlichkeit mit den Krystallen der phosphorsauren Ammon-Magnesia, von der die Hippursäure jedoch durch ihr chemisches Verhalten leicht zu unterscheiden ist. Sie ist geruchlos und von schwach bitterlichem Geschmack. Schmelzpunkt 187,5<sup>0</sup>. Sie löst sich in 600 Teilen Wasser von 0<sup>0</sup>, viel leichter in heissem (Liebig); bei 60<sup>0</sup> scheidet sich der grösste Teil der in der Siedehitze gelösten Säure wieder aus (Curtius)<sup>3)</sup>. Alkohol löst sie leicht, Äthyläther schwerer, Essigäther leichter als Äther, kochendes Chloroform sehr schwer (Curtius), Petroläther, Benzol, Schwefelkohlenstoff nicht. Die Lösungen röten Lackmus stark.

<sup>1)</sup> Haralamb Vasilu, Neue Untersuchungen über die Muttersubstanz der im Tierkörper erzeugten Hippursäure. Inaug.-Diss. Breslau 1906 u. Mitt. d. Landwirtsch. Inst. d. Univ. Breslau 4. 374. 1908.

<sup>2)</sup> G. J. Jaarsveld u. B. J. Stockvis, Arch. f. exper. Path. u. Pharmakol. 10. 268. 1879. — Sertoli, Gazz. degli ospedali e delle clin. 1898. Nr. 145 zit. n. Jahresber. f. Tierch. 28. 299. — J. Lewinski, Arch. f. exper. Path. u. Pharm. 82. 397. 1908 (Lit.).

<sup>3)</sup> Curtius, Journ. f. prakt. Ch. [2] 26. 149. 1882.

Nach Gonnermann<sup>1)</sup> löst sich 1 g Hippursäure bei ungefähr 18° in 77 cm Essigsäure, 165 cm Wasser, 400 cm Äthyläther, 1 Ltr. Chloroform; sie löst sich ferner in 100 Ltr. kaltem und 10 Ltr. siedendem Benzol.

2. Sie vereinigt sich mit Basen, aber nicht mit Säuren zu Salzen. Ihre Verbindungen mit den Alkalien und alkalischen Erden sind in Wasser und in Alkohol löslich, ihr Silber-, Kupfer- und Bleisalz ist in Wasser schwer löslich, das Eisenoxydsalz ist unlöslich. Das Silbersalz krystallisiert aus heissem Wasser in weissen, seideglänzenden Nadeln, das Kobaltsalz krystallisiert gut und ist in Alkohol unlöslich (Loebisch)<sup>2)</sup>. Säuren scheiden aus den Salzen die Hippursäure wieder in Krystallen ab.

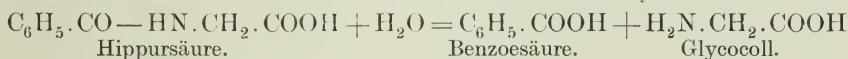
Hippursäure Salze geben mit Eisenoxydsalzen einen isabellfarbenen, flockigen, selbst in heissem Wasser unlöslichen, in heissem Alkohol leicht löslichen Niederschlag. — Mit basisch essigsäurem Blei gibt sie einen Niederschlag, wird aber beim Kochen mit Bleihydrat nicht abgeschieden.

Nach Donati<sup>12)</sup> löst sich Hippursäure zu 1 Mol. in  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , zu 2 Mol. in  $\text{Na}_3\text{PO}_4$ . Aus den stark sauer reagierenden Lösungen kristallisiert beim Verdunsten zuerst Hippursäure, welche sich dem Abdampfungsrickstand solcher Lösungen durch Alkohol entziehen lässt. Äther nimmt aus solchen Lösungen (alle) Hippursäure auf, auch dann noch, wenn die Lösung so viel  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  enthält, dass sie entschieden alkalisch reagiert.

3. Der nach den üblichen Methoden darstellbare Äthylester der Hippursäure krystallisiert aus kochendem Wasser in langen Nadeln vom Schmelzpunkte 60,5°.

Erhitzt man Hippursäure mit einigen Tropfen Alkohol und 1–2 Tropfen konzentrierter Schwefelsäure, so tritt Geruch nach Benzoesäureester auf.

4. Beim Kochen mit Laugen (aber nicht so leicht beim Kochen mit Kalkmilch), schneller noch beim Kochen mit Mineralsäuren, ferner bei anhaltendem Erhitzen mit Wasser auf 170—180° zerfällt die Hippursäure unter Wasseraufnahme in Benzoesäure und Glycocoll:



Nach Folin und Flanders<sup>4)</sup> gelingt es durch 16 stündiges Erhitzen mit 0,5 % iger Natronlauge auf dem Wasserbade 0,2 g Hippursäure nahezu quantitativ zu spalten.

Bei 1 stündigem Erhitzen von Hippursäure mit einer Lösung der Harnsalze auf 180—190° entwickelt sie nach Cazeneuve und Hugouenq<sup>5)</sup> kein Ammoniak.

5. Dieselbe Zersetzung erfährt die Hippursäure auch durch den *Micrococcus ureae* bei der alkalischen Hargärung; nur wird dabei das Glycocoll leicht weiter verändert (van Tieghem)<sup>6)</sup>.

Nach Seo <sup>7)</sup> spalten Staphylokokken und Streptokokken, die sich oft im Harn, der nicht in desinfizierten Gläsern gesammelt ist, finden,

<sup>1)</sup> M. Gonnermann, Pflügers Archiv **59**. 44. 1894.

2) W. F. Loebisch, Anleitung zur Harnanalyse II. Aufl. Wien u. Leipzig 1881. S. 133.

<sup>3)</sup> Jul. Donath, Journ. f. prakt. Ch. [2] 9. 173. 1874.

<sup>4</sup>) O. Folin and F. F. Flanders, Journ. of biolog. chem. **11**. 257. 1912.

<sup>5)</sup> Cazeneuve u. Hugounenq, Bull. de la Soc. chim. [2] 48. 82. 1887.

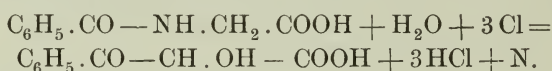
<sup>6)</sup> van Tieghem, Ann. scient. de l'école normale supérieure I. 4. 209. 1864; Ann. des sc. natur. [5] 2. 168. 1864; Comptes rendus 58. 210. 1864.

<sup>7)</sup> Seo a. a. O. 446.

die Hippursäure ebenfalls schnell in grosser Menge, während *Bact. coli*, Typhus- und Paratyphusbazillen und *Bacillus pyocyaneus* dazu nicht imstande sind. Ob solche Spaltungen durch Bakterien auch im infizierten Körper vorkommen, muss noch untersucht werden.

Auch aus Organen von Hunden und Schweinen lassen sich nach Schmiedeberg und Minkowski Auszüge gewinnen, Lösungen des „Histozyms“, welche die Hippursäure in Glycocoll und Benzoesäure zerlegen. Dagegen geht dem Trypsin (Gulewitsch) und dem Erepsin (Cohnheim)<sup>1)</sup> diese Fähigkeit ab.

6. In alkalischer Lösung wird sie nach Gössmann durch Chlor in kurzer Zeit in Benzoylglycolsäure übergeführt:

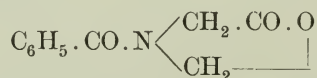


Die freie Hippursäure wird dagegen selbst in siedender wässriger Lösung von Chlor nicht verändert (Curtius).

7. Mit Bromlauge entwickelt sie keinen Stickstoff (Knop und Wolf, Hüfner, Esbach). Dagegen gibt sie nach Denigès<sup>2)</sup> beim Kochen mit dem Reagens einen kermesfarbenen Niederschlag, den Benzoesäure nicht gibt.

Die Abänderung dieser Reaktion und ihre Anwendung zum Nachweis der Hippursäure durch Dehn s. unter D.

8. Löst man Hippursäure in konzentrierter Schwefelsäure und fügt polymeren Formaldehyd im Überschuss hinzu, oder erhitzt man Hippursäure mit Formaldehydlösung mit oder ohne Anwendung von Kondensationsmitteln, so entsteht Methylenhippursäure von der wahrscheinlichen Formel



Sie krystallisiert aus heissem Essigester in grossen Prismen vom Schmelzpunkt 151<sup>0</sup>, ist in Wasser wenig, in heissem Benzol und Petroläther löslich. (Patent der Chemischen Fabrik auf Aktien [vormals E. Schering<sup>3)</sup>]).

9. Hippursäure liefert, wie S. 592 erörtert, mit Natriumacetat, Essigsäureanhydrid und Benzaldehyd erhitzt, nach Erlenmeyer jr.

<sup>1)</sup> O. Schmiedeberg, Arch. f. exper. Pathol. u. Pharm. **14**. 378. 1881. — O. Minkowski, ebenda **17**. 445. 1883. — W. Gulewitsch, Ztschr. f. physiol. Ch. **27**. 540. 1899. — O. Cohnheim, ebenda **52**. 526. 1907.

<sup>2)</sup> Knop u. Wolf, Chem. Zentralbl. 1860. 258. — Hüfner, Journ. f. prakt. Ch. [2] **3**. 18. 1871. Esbach, Gazette méd. de Paris **24**. 1873. — G. Denigès, Comptes rendus **107**. 662.

<sup>3)</sup> Ref. im Chem. Zentralbl. 1904. I. 411.

das Lactimid der Benzoylaminozimtsäure. Ähnliche Kondensationen mit Bildung charakteristischer Lactimide erfolgen mit vielen anderen Aldehyden.

10. Lässt man starke Salpetersäure in der Siedehitze auf Hippursäure einwirken, dampft zur Trockne ab, bringt den Rückstand in ein Glasröhrchen und erhitzt, so entwickelt sich ein intensiver, bittermandelähnlicher Geruch von Nitrobenzol. Da selbst noch Spuren von Nitrobenzol ziemlich anhaltend einen starken Geruch verbreiten, so ist diese Reaktion zur Entdeckung selbst sehr kleiner Mengen von Hippursäure anwendbar (Lücke)<sup>1)</sup>.

Dasselbe Resultat gibt die Benzoesäure; bei der Zimtsäure verdeckt der spezifische Zimtgeruch jeden anderen. Albumin, Leim, Harnsäure, Harnzucker, Salicin, Salicylsäure, Cholidinsäure, Anissäure, Pyrogallussäure, Chinasäure, Pikrinsäure, Naphthalin, Phtalsäure, Indigo, Isatin geben diese Reaktion nicht.

11. Bei der Behandlung mit salpetriger Säure entwickelt die Hippursäure nur Spuren Stickstoff (Heinrich), auch in der Wärme nicht mehr, wenn die Säure nicht vorher zu Glycocoll und Benzoesäure zersetzt ist (Kreusler)<sup>2)</sup>.

12. Bei schwachem Erhitzen im Reagenzglas schmilzt die Hippursäure zu einer öligen Flüssigkeit, die beim Erkalten wieder krystallinisch erstarrt; bei stärkerem Erhitzen färbt sich die geschmolzene Masse rot, zieht sich an der Wand des Glases in die Höhe, gibt ein Sublimat von Benzoesäure und entwickelt zugleich anfangs einen angenehmen Heugeruch, später den nach Blausäure.

C. Darstellung. 1. Im grossen. Man verwendet am zweckmässigsten Harn von Pferden, Kühen, Schafen, die mit Gras oder Wiesenheu gefüttert worden sind. Der Harn muss in reinen Gefässen aufgefangen und in möglichst frischem Zustand verarbeitet oder unmittelbar nach der Entleerung sterilisiert werden. Die Darstellung bietet nur insofern Schwierigkeiten, als es nicht leicht ist, die Hippursäure farblos zu erhalten; auf diesen Punkt sind alle Bestrebungen gerichtet.

a) Man kocht nach Gregory Pferdeharn mit Kalkmilch auf, coliert, dampft schnell auf  $\frac{1}{6}$  oder  $\frac{1}{8}$  ein und übersättigt mit Salzsäure, sammelt die nach 24 Stunden auskrystallisierte, noch rötliche Hippursäure, kocht sie nochmals mit Kalkmilch, filtriert und fällt wieder mit Salzsäure. — Nach H. Schwarz dampft man den Harn auf  $\frac{1}{6}$ — $\frac{1}{8}$  ein, versetzt ihn mit Salzsäure im Überschuss, löst den Niederschlag in heisser Kalkmilch, fällt in der Wärme mit kohlensaurem Alkali, das Filtrat mit Chlorealcium, filtriert wieder und schlägt die Hippursäure mit Salzsäure nieder. Man löst die Hippursäure wieder in überschüssiger Kalkmilch in der Wärme, behandelt die Lösung mit Kohlensäure, wobei ein stark gefärbter Niederschlag entsteht, und fällt das Filtrat mit Salzsäure. — Hansen<sup>3)</sup> löst die rohe Säure kochend in Kalkmilch und Wasser und fällt die alkalische Lösung in der Wärme mit konzentrierter Ammoncarbonatlösung und mit Chlorealcium. Aus dem abgekühlten

<sup>1)</sup> Lücke, Archiv f. pathol. Anat. 19. 196. 1860.

<sup>2)</sup> F. Heinrich, Sachsses Phytochem. Unters. 1. 101. — U. Kreusler, Landwirtsch. Versuchsst. 31. 310. 1885.

<sup>3)</sup> Gregory, Ann. d. Chem. u. Pharm. 63. 125. 1847. — H. Schwarz, Ann. d. Chem. u. Pharm. 54. 29. 1845. — G. Hansen, Jahresber. f. Tierchem. 1881. 116.



Filtrat wird die Hippursäure mit Salzsäure niedergeschlagen. Diese Reinigung wird, wenn nötig, wiederholt. Auch kann man die rohe Säure vorher mit Permanganat teilweise entfärben. (In den Mutterlaugen bleibt viel Hippursäure zurück.)

b) Bensch<sup>1)</sup> versetzt die heisse Lösung der rohen Hippursäure in Kalkmilch mit so viel Alaunlösung, bis die Flüssigkeit nicht mehr alkalisch reagiert, lässt sie auf 40° erkalten, fällt mit kohlensaurem Natron aus und das Filtrat mit Salzsäure; die abgeschiedene Hippursäure wird dann in wässriger Lösung noch mit Tierkohle entfärbt. — Schnell und sicher führt folgendes Verfahren zum Ziele. Die rohe Hippursäure wird in heissem Wasser gelöst, mit Alaun und dann so viel kohlensaurem Natron versetzt, dass ein reichlicher Niederschlag entsteht, die Flüssigkeit aber noch sauer reagiert. Das Filtrat wird zur Krystallisation verdunstet und, wenn nötig, noch mit Salzsäure versetzt. Der Farbstoff, welcher den Krystallen noch anhaftet, lässt sich leicht durch blosses Umkrystallisieren oder durch Tierkohle entfernen (Huppert).

c) Löwe löst in der heissen, mit Salzsäure versetzten Lösung etwas Zink auf und fügt der Flüssigkeit zuletzt etwas Kohle zu. Die Krystalle dunkeln am Licht wieder nach (Conrad)<sup>2)</sup>. Oder er löst die Hippursäure in kohlensaurem Natron und kocht mit Zinkvitriol und Tierkohle; die entfärbte Flüssigkeit wird mit Salzsäure gefällt.

d) Zinnoxidul reduziert in alkalischer Hippursäurelösung den Farbstoff und fällt ihn zugleich. Salzsäure fällt darauf weisse Hippursäure (Conrad)<sup>2)</sup>.

e) Zur Entfärbung der (freien) Hippursäure sind auch Oxydationsmittel vorgeschlagen worden: übermangansaures Kali (Gössmann), Chlorkalk (Liebig), Chlor (Dauber, Cazeneuve), Salzsäure und chloresaures Kali (Rieckher), kalte Salpetersäure (Hutstein, Conrad). Das Verfahren von Gössmann ist gut, nur geht dabei neben dem Kali auch Manganoxydul in Lösung, das durch Salzsäure entfernt werden kann. Die Behandlung mit Chlor wird von Curtius<sup>3)</sup> empfohlen. Man verfährt dabei so, dass man in die siedende wässrige Lösung der Säure Chlor leitet, bis die Lösung nur noch pomeranzenrot ist, die Lösung abkühlt, die Mutterlauge schnell von den Krystallen trennt und diese ein paar Mal mit kaltem Wasser wäscht. Man löst die Krystalle wieder und entfärbt mit Chlor, bis die Lösung hellgelb ist. Den Rest des Farbstoffs kann man durch Umkrystallisieren mit Tierkohle beseitigen.

f) Von beigemengter Benzoesäure, die sich schon an dem Auftreten einer milchigen Trübung bei der Abscheidung der Säure kenntlich macht, lässt sich die Hippursäure befreien, wenn man sie mit Wasser übergiesst, und die Mischung mit Petroleumäther schüttelt.

2. Im kleinen. Man nimmt soviel Harn in Arbeit, dass man auf ungefähr 0,5 g Hippursäure an Ausbeute rechnen kann, von gewöhnlichem Menschenharn 1 Liter oder die ganze Tagesmenge. Diabetischen Harn lässt man vorher mit Hefe vergären, was nach Cazeneuve keinen Verlust an Hippursäure zur Folge haben soll, stark eiweisshaltigen Harn befreit man vorher durch Hitzeoagulation in essigsaurer Lösung vom Eiweiss.

a) Verfahren von Bunge und Schmiedeberg<sup>4)</sup>. Der Harn wird, wenn er sauer ist, mit kohlensaurem Natron alkalisch gemacht,

<sup>1)</sup> Bensch, Ann. d. Chem. u. Pharm. 58. 267. 1846.

<sup>2)</sup> Löwe, Journ. f. prakt. Ch. 65. 372. — W. Conrad, Journ. f. prakt. Ch. [2] 15. 243. 1877.

<sup>3)</sup> Curtius a. a. O.

<sup>4)</sup> G. Bunge u. Schmiedeberg, Archiv f. exper. Pathol. 6. 235. 1876.

das Filtrat fast zur Trockne verdunstet und der Rückstand wiederholt mit kaltem Alkohol ausgezogen. Von der Lösung wird der Alkohol vollständig abdestilliert, die rückständige wässrige Flüssigkeit mit Salzsäure angesäuert und wiederholt mit immer neuen Portionen Essigäther (wenigstens 5 mal) ausgeschüttelt. Der abgehobene Essigäther wird durch Schütteln mit Wasser gewaschen und bei mässiger Temperatur verdunstet, wonach die Hippursäure neben Benzoessäure und anderen in Essigäther löslichen Substanzen zurückbleibt; von diesen Verunreinigungen lässt sich die Hippursäure durch Behandeln mit Petroläther befreien, welcher die Hippursäure ungelöst zurücklässt. Die Säure wird dann in wenig warmem Wasser gelöst, die Lösung mit etwas Tierkohle digeriert und bei höchstens 50—60° zur Krystallisation verdunstet.

Der Äther bildet mit den Lösungen, mit denen er geschüttelt wird, oft Emulsionen, in denen eine Trennung der Flüssigkeiten in zwei Schichten schlecht von statten geht; diesem Übelstand lässt sich vorbeugen, wenn man die Flaschen, in welchen man die Flüssigkeiten schütteln will, nahezu ganz anfüllt. — Nach W. v. Schröder <sup>1)</sup> lässt sich eine bessere Trennung der Essigätherlösung von dem Waschwasser erreichen, wenn man dem Wasser etwas Kochsalz zufügt.

Krystallisiert die erhaltene Hippursäure nicht, so verwandelt man sie nach Bunge und Schmiedeberg durch Kochen ihrer wässrigen Lösung mit kohlensaurem Zink in das Zinksalz, dampft die Lösung ein, nimmt das hippursäure Zink mit Alkohol auf, verdunstet den Alkohol und behandelt den Rückstand mit verdünnter Salzsäure und Essigäther. — Schultzen entfernte die die Krystallisation störenden fremden Stoffe in der Weise, dass er den Extraktionsrückstand in Wasser löste, die Lösung mit einem Tropfen Bleiessig fällte, das Filtrat mit Schwefelwasserstoff behandelte, eindampfte und nach dem Erkalten mit etwas Salzsäure versetzte.

Aus einem trockenen Gemenge von Benzoessäure und Hippursäure zieht Chloroform nach Fischer die Benzoessäure sehr schnell aus und lässt die Hippursäure fast quantitativ zurück; versetzt man eine Lösung beider Säuren mit viel Chloroform, so wird die Hippursäure nach und nach beinahe vollständig gefällt, während die Benzoessäure vollständig in Lösung bleibt. — Gonnermann <sup>2)</sup> bewerkstelligt die Trennung der beiden Säuren in der Weise, dass er den Essigätherauszug zum Sirup verdunstet, und den Rückstand in Chloroform löst, dem auf 100 cem 5 cem Benzol zugesetzt sind. Die anfänglich klare Lösung trübt sich schnell unter Abscheidung von Hippursäure. Nach 24 Stunden wäscht man den Niederschlag an der Saugpumpe erst mit benzolhaltigem, dann mit reinem Chloroform, bis dieses auf dem Uhrglas keinen tropfenförmigen Rückstand mehr hinterlässt. Die Hippursäure ist vollkommen weiss.

b) Das Verfahren von G. Meissner <sup>3)</sup> bezweckt namentlich eine vollständige Trennung der Hippursäure von der Bernsteinsäure.

Der Harn wird mit Barytwasser ausgefällt, der überschüssige Baryt vorsichtig mit Schwefelsäure entfernt, das noch alkalische Filtrat mit Salzsäure vollends genau neutralisiert, bis zur Sirupkonsistenz eingedampft und die noch heisse Flüssigkeit sofort mit soviel absolutem Alkohol versetzt, bis keine Trübung mehr entsteht.

<sup>1)</sup> W. v. Schröder, Ztschr. f. physiol. Ch. 3. 325. 1879.

<sup>2)</sup> Ch. S. Fischer, Ztschr. f. physiol. Ch. 19. 171. 1894. — M. Gonnermann, Pflügers Archiv 59. 44. 1894.

<sup>3)</sup> G. Meissner und C. U. Shepard, Untersuchungen über die Entstehung der Hippursäure. Göttingen 1866. II u. 108.

Die alkoholische Lösung, welche alle Hippursäure und keine Bernsteinsäure enthält, wird durch Verdunsten völlig vom Alkohol befreit, der Rückstand noch warm mit einigen Tropfen konzentrierter Salzsäure versetzt und wiederholt mit Äther ausgeschüttelt. Nach dem Verdunsten des Äthers pflegt die Hippursäure auszukristallisieren.

c) Cazeneuve<sup>1)</sup> dunstet 250 ccm Harn auf 25 ccm ein, fügt dann 5 ccm Salzsäure (nach Loebisch besser Essigsäure) und 50 g gebrannten Gips zu und trocknet vollends. Der Rückstand wird gepulvert und in einem Extraktionsapparat mit wasser- und alkoholfreiem Äther (besser Essigäther) völlig erschöpft. Vom Auszug wird der Äther abgedunstet und der Rückstand aus wenig Wasser umkristallisiert.

d) Völker<sup>2)</sup> wendet ein dem Cazeneuveschen Verfahren ähnliches an.

Es werden 200—300 ccm Harn in einer Hofmeisterschen Glasschale von 100 ccm Fassungsraum auf ein Drittel eingedampft, dann mit 4 g Natriumphosphat (B. 2) versetzt, und, wenn der Rückstand sirupdick geworden ist, mit überschüssigem gebranntem Gips. Dann wird vollends getrocknet, die Masse samt der Schale gepulvert und das Pulver im Soxhletschen Extraktionsapparat erst 4—6 Stunden mit frisch rektifiziertem Petroläther vom Siedepunkt 60—80°, und darauf 6—10 Stunden mit wasser- und alkoholfreiem Äther ausgezogen. Nach dem Verjagen des Äthers wird der Rückstand in heissem Wasser gelöst, mit Tierkohle entfärbt, die Kohle völlig mit heissem Wasser ausgewaschen und die Lösung bei 50—60° auf 1—2 ccm eingedampft und der Krystallisation überlassen. Die Krystalle werden noch mit einigen Tropfen Wasser und Äther nachgewaschen.

3. Zur Darstellung im grossen wie im kleinen aus Herbivoren-harn empfiehlt Roaf<sup>3)</sup> folgende einfache Methode:

Man setzt zu 1 Liter Harn 250 g Ammonsulfat oder das gleiche Volum gesättigte Ammonsulfatlösung und 15 ccm konzentrierte, 98%ige Schwefelsäure. Die Krystallisation beginnt schon nach 10—20 Minuten. Zur vollständigen Abscheidung lässt man 24 Stunden stehen. Will man die Krystallisation beschleunigen, so fügt man mehr Ammonsulfat zu. Die Krystalle sind nur wenig gefärbt und können durch Umkristallisieren aus heissem Wasser mit Tierkohle farblos erhalten werden. 25 ccm Kuhharn genügen zur Darstellung von krystallisierter Hippursäure.

D. Nachweis. 1. Zum Nachweis im Harn ohne vorhergehende Isolierung benutzt Dehn<sup>4)</sup> das Verhalten gegen Natriumhypobromitlösung (s. B. 7):

Man versetzt einige ccm Harn mit so viel Natriumhypobromitlösung, als nötig ist, um den Harnstoff zu zersetzen und das Gemisch

<sup>1)</sup> P. Cazeneuve, Journ. de Pharm. et de Chimie [4] 29. 309. 1879; Ztschr. f. analyt. Ch. 19. 252.

<sup>2)</sup> O. Völker, Chem. Zentralbl. 1887. 125.

<sup>3)</sup> H. E. Roaf, Biochem. Journal 3. 185. 1908.

<sup>4)</sup> W. M. Dehn, Journ. of the Americ. Chem. Soc. 30. 1507 zit. n. Jahresber. f. Tierch. 38. 322.



bleibend gelb zu färben. Beim Erhitzen zum Sieden entsteht ein orange-farbiger oder braunroter Niederschlag, bei Spuren nur eine rauchige oder schwach rote Färbung. Nach einiger Zeit scheidet sich ein aus Erdphosphaten und der braunen amorphen Substanz bestehender Niederschlag ab. Die aus reiner Hippursäure gewonnene Substanz enthält C, H, N und Br und entwickelt beim Kochen mit Wasser Isonitrilgeruch. — Harnsäure, Benzoessäure, Oxalsäure, Fettsäure, Kreatin, Aceton, Acetessigsäure, Glycose, Glycogen, Leucin geben keine Färbungen.

2. Sicherer erscheint es für den Nachweis, die Hippursäure als solche zu isolieren, wozu eine der unter C. 2 oder 3 beschriebenen Methoden zu verwenden ist. Die krystallisierte Hippursäure erkennt man leicht an ihrer Krystallform (B. 1), ihrem Verhalten bei der trockenen Destillation (B. 12) und ihrer leichten Löslichkeit in Alkohol und heissem Wasser. Neben diesen Proben lassen sich zur weiteren Bestätigung die Lückesche Reaktion (B. 10) und das Verhalten eines ihrer Salze gegen säurefreies Eisenchlorid (B. 2) sowie die Überführung in ein Lactimid (B. 9) verwenden. Durch die Bestimmung des Schmelzpunktes lässt sie sich leicht und sicher von der Phenacetursäure (s. nächstes Kapitel) unterscheiden.

### E. Bestimmungsmethoden.

Mit Rücksicht auf die leicht eintretende Zersetzung der Hippursäure (s. B. 5) empfiehlt es sich den Harn in sterilen Gefässen aufzufangen, event. unter Zusatz von Chloroform zu sammeln, und frisch zu verarbeiten, oder den Harn nach der Entleerung aufzukochen. Zusatz von Phenol oder Thymol als Antisepticum kann bei manchen Bestimmungsmethoden Fehler veranlassen (vgl. die Polemik Brugsch-Lewinski<sup>1</sup>).

### I. Darstellung und Wägung der Hippursäure.

#### 1. Verfahren von Bunge und Schmiedeberg.

Bunge und Schmiedeberg bestimmten die Hippursäure nach dem unter C. 2 angegebenen Verfahren. Man verwendet 100—200 ccm Harn. Die gewonnene Hippursäure lässt sich nach dem Trocknen gleich in dem Schälchen wägen, in welchem sie auskrystallisiert ist.

Bei Versuchen mit Lösungen reiner Hippursäure fanden Bunge und Schmiedeberg bei 5 maligem Ausschütteln der Flüssigkeit mit Essigäther 97,4% wieder. v. Schröder<sup>2</sup>) erhielt stets gut untereinander übereinstimmende Resultate und

<sup>1</sup>) Th. Brugsch, Ztschr. f. exper. Pathol. u. Ther. **5**. 731. 1909. — J. Lewinski, Arch. f. exper. Path. u. Pharm. **61**. 88. 1909.

<sup>2</sup>) W. v. Schröder, Ztschr. f. physiol. Ch. **3**. 323; Ztschr. f. analyt. Ch. **19**. 252. 1879.



fand von der einem Hammel beigebrachten Benzoesäure 94,2 und 99,6% als Hippursäure wieder.

Die Methode gibt bei irgend erheblichen Hippursäuremengen sehr gute Resultate, lässt aber bei kleinen Mengen z. B. im normalen Kaninchenharn im Stich (Jaarsveld und Stockvis, Blumenthal, Wiechowski, Riecke)<sup>1)</sup>.

Lewinski<sup>2)</sup> betont folgende Kautelen: 1. Man überzeuge sich, dass die Extraktion mit Essigäther erschöpfend ist. 2. Der Essigäther-Auszug muss in grossen Glasschalen verdunstet werden, damit nichts über den Rand steigt. 3. Zum Umkrystallisieren des Essigäther-Rückstandes müssen möglichst kleine Flüssigkeitsmengen verwandt werden. 4. Die gereinigte Substanz soll auf dem Boden eines engen Becherglases auskrystallisieren. 5. In der abgehobenen, auf 3—4 ccm eingegangenen Mutterlauge ist die Ausscheidung von Restkrystallen abzuwarten.

## 2. Modifikation von Rem-Picci<sup>3)</sup>.

200—400 ccm Harn werden mit einer Lösung von 5 g Chlorbaryum in 100 ccm gesättigter Barytlösung versetzt, so lange noch ein Niederschlag ausfällt. Dieser wird mit warmem Wasser ausgewaschen. Enthält das Filtrat Eiweiss, so behandelt man es mit Alkohol, den man später auf dem Wasserbad entfernt. Man säuert mit Salzsäure an und extrahiert 7 mal mit Essigäther (zuerst mit 150 ccm, dann mit weniger), wäscht die vereinigten Auszüge mit Wasser, destilliert den Essigäther ab und verfährt weiter wie bei 1.

Nach Astolfoni<sup>4)</sup> soll das Verfahren von Rem-Picci bessere Werte geben als das von Bunge-Schmiedeberg.

Nach Wiechowski lassen sich die Verfahren von Bunge-Schmiedeberg und Rem-Picci kombinieren, indem man den Harn in derselben Weise vorbereitet, wie zur Harnstoffbestimmung nach Mörner-Sjöqvist (s. S. 571).

## 3. Methode von Dakin<sup>5)</sup>.

300—500 ccm Harn — je nach dem Hippursäuregehalt — werden auf dem Wasserbad auf ein Volum von etwa 100 ccm eingengt, in einen Extraktionsapparat gebracht, stark mit Phosphorsäure angesäuert und einen Tag mit Essigäther extrahiert. Die Essigätherlösung, die wenigstens 200 ccm betragen soll und viele Verunreinigungen enthält, wird im Scheidetrichter viermal mit gesättigter Kochsalzlösung — im

<sup>1)</sup> Jaarsveld u. Stockvis, Arch. f. exper. Path. u. Pharmak. **10**. 268. 1879. — F. Blumenthal, Ztschr. f. klin. Med. **40**. 339. 1900. — W. Wiechowski, Hofmeisters Beiträge **7**. 262 ff. 1905. — Riecke a. a. O.

<sup>2)</sup> J. Lewinski, Arch. f. exper. Path. u. Pharmakol. **58**. 399. 1908.

<sup>3)</sup> G. Rem-Picci, Archivio di farmac. speriment. e scienze affini **1**. 7. 1902 zit. nach Jahresb. f. Tierch. **32**. 316.

<sup>4)</sup> G. Astolfoni, Arch. internat. de pharmacodyn. **14**. 39. 1905.

<sup>5)</sup> H. D. Dakin, Journ. of biologic. chem. **7**. 106. 1909/10.

ganzen 75 ccm — geschüttelt, wodurch eine erhebliche Menge Harnstoff beseitigt wird. Sie wird dann zur Entfernung von Kochsalz mit wenigen ccm Wasser gewaschen, die vereinigten Waschflüssigkeiten mit etwas Essigäther ausgeschüttelt, der nach sorgfältiger Trennung und nochmaligem Waschen mit Wasser mit der Hauptmenge der Essigätherlösung vereinigt wird. Die vereinigten Essigätherlösungen werden in einem Rundkolben im Wasserdampfstrom destilliert, bis 750 ccm Destillat gesammelt sind. Hierdurch werden flüchtige Säuren in ansehnlicher Menge entfernt.

Die heisse wässrige Lösung wird mit wenig Tierkohle gekocht, filtriert und der Rückstand mit kochendem Wasser ausgewaschen. Bei erheblichem Gehalt an Hippursäure lässt man aus der Lösung durch längeres Stehen in der Kälte einen grossen Teil der Säure auskrystallisieren. Das Filtrat von den Krystallen wird im Scheidetrichter vorsichtig mit einem Gemische von 2 Teilen Benzol und 1 Teil alkohol-freiem Äther geschüttelt, wodurch die geringen Beimengungen von Indollessigsäure, Oxyphenyllessigsäure und verwandten Substanzen entfernt werden. Die wässrige Hippursäurelösung wird zur Trockne verdampft, der Rückstand in wenig kochendem Wasser aufgenommen, und die filtrierte Lösung in ein gewogenes Glasschälchen übergeführt, in das man auch die vorher erhaltene Hippursäure bringt. Den Inhalt des Schälchens lässt man bei gelinder Temperatur verdunsten und erhält so die Säure relativ rein, wie Schmelzpunkts- und Stickstoffbestimmung zeigen. Die Menge nicht krystallisierbarer Substanz, die in verschiedenen Versuchen annähernd konstant ist, beträgt höchstens etwa 20 mg. Der Rückstand im Schälchen wird bei 100° getrocknet und die Reinheit durch eine Stickstoffbestimmung nach Kjeldahl kontrolliert.

Ringer<sup>1)</sup> fand nach Dakins Methode von zugesetzter Hippursäure 97,87% wieder.

Prüfung auf freie Benzoesäure nach Dakin s. S. 816.

4. Völker verwendete das unter C. 2 d) beschriebene Verfahren zur quantitativen Bestimmung der Hippursäure. Die auf einem trockenen gewogenen (Glaswoll-) Filter gesammelten Krystalle werden mit einigen Tropfen Wasser und Äther gewaschen und für je 1 ccm Filtrat der gewogenen Hippursäure 1,5 mg hinzugerechnet. Die Resultate sollen sehr befriedigend sein.

5. Cazeneuve empfiehlt die von ihm beschriebene Methode der Hippursäuregewinnung aus Harn (s. C. 2. c.) auch zur quantitativen Bestimmung, aber ohne den Nachweis ihrer Verwendbarkeit.

<sup>1)</sup> A. J. Ringer, Journ. of biol. chem. 10. 329. 1911.

## II. Bestimmung des Hippursäure-Stickstoffs.

Blumenthal<sup>1)</sup> schüttelt das mit Salzsäure angesäuerte alkoholische Extrakt des Harns mit einem Gemisch von Äther und Alkohol (10:1) viermal, wäscht mit Wasser, destilliert den Äther ab und bestimmt im Rückstand den Stickstoff nach Kjeldahl, woraus der Hippursäure-Gehalt errechnet wird.

Das Verfahren ist von Soetbeer einer scharfen Kritik unterzogen worden, die Blumenthal und Braunstein<sup>2)</sup> zurückzuweisen versuchten, doch fanden auch sie, dass nach Blumenthal um 15% niedrigere Werte erhalten werden als nach Bunge-Schmiedeberg.

Abderhalden und Hirsch<sup>3)</sup> schütteln 50 ccm Harn (von Kaninchen) nach Ansäuern mit Salzsäure mit je 50 ccm Essigäther aus. Die Essigätherauszüge werden zur Entfernung aufgenommenen Harnstoffs mit Wasser ausgeschüttelt und dann im Vakuum eingedampft. Der Rückstand wird in Wasser gelöst, die Lösung im Messkolben auf 50 ccm aufgefüllt und in zwei Proben von je 10 ccm dieser Lösung der Hippursäuregehalt durch Stickstoffbestimmung nach Kjeldahl festgestellt.

## III. Bestimmung der Hippursäure durch Formoltitration (nach Henriques-Sørensen) s. S. 646.

## IV. Methoden, nach welchen die freie und gebundene Benzoesäure bestimmt wird.

Die im folgenden zu beschreibenden Verfahren begehen sämtlich den Fehler, dass die abgespaltene Benzoesäure nicht notwendig aus Hippursäure stammen muss, sondern auch durch Spaltung der von Magnus-Levy zuerst dargestellten Benzoeglycuronsäure (s. Kap. „Körperfremde Stoffe“), die nur unvollständig in das alkoholische Harn-Extrakt hineingeht (Brugsch), entstanden sein kann. Zwar ist diese Verbindung im Harn bisher nur nach Fütterung reichlicher Mengen von Benzoesäure gefunden worden, und der Fehler dürfte bei Bestimmungen in normalem Harn kaum ins Gewicht fallen. Indessen ist vorerst nicht mit Sicherheit auszuschliessen, dass die Benzoeglycuronsäure nicht auch in diesem in kleinen Mengen vorkommt. Bei Versuchen über den quantitativen Verlauf des Übergangs von Benzoesäure in Hippursäure ist die Paarung mit Glycuronsäure nach Erfahrungen von Lewinski<sup>4)</sup> auch beim Menschen zu berücksichtigen.

### 1. Methode von Jaarsveld und Stockvis<sup>5)</sup>.

a) Das Essigätherextrakt wird gewonnen wie nach Bunge-Schmiedeberg und mit Petroläther vollständig erschöpft, dann in 10–20 ccm starker Natronlauge gelöst und damit  $\frac{1}{4}$ – $\frac{1}{2}$  Stunde gekocht. Nach Abkühlung wird die Flüssigkeit mit so viel Salzsäure versetzt, dass sie eine deutlich saure Reaktion zeigt, und

<sup>1)</sup> F. Blumenthal, Ztschr. f. klin. Med. 40. 339. 1900.

<sup>2)</sup> F. Soetbeer, Ztschr. f. physiol. Ch. 35. 536. 1902. — F. Blumenthal u. A. Braunstein, Hofmeisters Beiträge 3. 385. 1903.

<sup>3)</sup> E. Abderhalden u. P. Hirsch, Zeitschr. f. physiol. Chem. 78. 299. 1912.

<sup>4)</sup> A. Magnus-Levy, Biochem. Ztschr. 6. 502. 1907. — Th. Brugsch, Ztschr. f. exper. Pathol. u. Therapie. 5. 734. 1909. — Lewinski, a. a. O. S. 404.

<sup>5)</sup> G. J. Jaarsveld u. B. J. Stockvis, Arch. f. exper. Pathol. u. Pharmak. 10. 271. 1879.



mit Petroläther ausgeschüttelt. Der nach einiger Zeit in ein grosses Becherglas abgegossene Petroläther wird der freiwilligen Verdunstung überlassen. Der Rückstand besteht aus reinen Krystallen von Benzoesäure, die trocken gewogen und auf Hippursäure umgerechnet werden. — 100 g Benzoesäure entsprechen 146,7 g Hippursäure.

b) 100 oder 200 cem Harn werden, falls sie nicht alkalisch sind, mit Soda leicht alkalisch gemacht und zur Sirupdicke eingedampft. Der abgekühlte Sirup wird mit Salzsäure versetzt, 24 Stunden sich selbst überlassen, dann wiederholt mit Essigäther ausgeschüttelt. Der meist mehr oder weniger gefärbte Essigäther wird vorsichtig abgegossen. Wenn die Schichten sich schwer trennen, so führt Zusatz von viel Essigäther oder einigen Tropfen absoluten Alkohols zum Ziele (van de Velde und Stockvis)<sup>1)</sup>. Der Essigäther wird der freiwilligen Verdunstung überlassen, der Rückstand zur Bestimmung der freien Benzoesäure mit Petroläther extrahiert und wie unter a) weiter behandelt.

Die Verluste in Harnen mit Hippursäure-Zusatz betragen nach van de Velde und Stockvis höchstens 12%.

c) Modifikation von Wiener<sup>2)</sup>.

Der mit Soda schwach alkalisch gemachte Harn wird in einem Kölbchen im Luftstrom abgedampft und darin mit Alkohol extrahiert um die Extraktion möglichst vollständig zu gestalten. Der mit Wasser aufgenommene Alkoholextrakt wird mit Schwefelsäure angesäuert und im Extraktionsapparat — im Anschluss an einen Vorschlag von Kronecker<sup>3)</sup> — mit einem Gemisch von Äther und etwas Essigäther extrahiert. Die Extraktionsflüssigkeit wird auf dem Wasserbad abgedampft, der Rückstand in heissem Wasser gelöst und im Apparat mit Petroläther vom Siedepunkt 30—60° zur Gewinnung der freien Benzoesäure extrahiert. Der Petroläther wird im Kölbchen bei Zimmertemperatur im Luftstrom abgedampft, das Kölbchen durch Luftdurchleiten auf Gewichtskonstanz gebracht und die freie Benzoesäure gewogen. Der Rückstand aus dem Extraktionsapparat wird in einem Kölbchen mit 10 cem 35%iger Natronlauge eine Stunde gekocht, die gekochte Lösung mit Schwefelsäure stark angesäuert und die frei gemachte Benzoesäure im Apparat mit Petroläther extrahiert und wie vorher die freie Benzoesäure bestimmt.

Die Bestimmung dauert 3—4 Tage.

d) Modifikation von R. Cohn<sup>4)</sup>.

Das alkoholische Harnextrakt wird mit möglichst wenig Wasser in einen Schütteltrichter gespült, abgekühlt, mit konzentrierter Salzsäure stark angesäuert und viermal mit grossen Portionen Äther ausgeschüttelt. In den Äther geht die gesamte freie Benzoesäure und ein Teil der Hippursäure, während meist ein Teil der ausgeschiedenen Hippursäure, im Äther suspendiert, mit ihm zusammen von der salzsauren, wässrigen Lösung abgetrennt wird. Die ätherische Lösung wird nach dem Absetzen der mitgerissenen Hippursäure abfiltriert, der letzte Rest mit frischem Äther nachgespült und vollständig abdestilliert; der trockene Rückstand wird viermal mit grossen Mengen Petroläther (Siedepunkt 30—60°) zur Gewinnung der freien Benzoesäure ausgekocht. — Hierauf werden sämtliche Hippursäure enthaltenden Portionen vereinigt und der Äther aus der salzsauren Lösung durch Erwärmen verjagt. Die von Äther befreite Lösung wird mit mindestens der dreifachen Menge konzentrierter Salzsäure versetzt und 5 Stunden am Rückflusskühler auf dem Sandbade gekocht, was zur Spaltung der gesamten Hippursäure genügt. Nach dem Abkühlen wird die Lösung viermal mit Äther ausgeschüttelt, und der Ätherrückstand wird mit Petroläther extrahiert, aus dem die frei gemachte Benzoesäure wie oben gewonnen wird.

Nach Cohn soll die Methode sich im Kontrollversuch bewährt haben und abgesehen von der Gewinnung der alkoholischen Harnextrakte in etwa 24 Stunden ausführbar sein.

<sup>1)</sup> A. van de Velde u. B. J. Stockvis, Arch. f. exper. Pathol. u. Pharmak. 17. 193. 1883.

<sup>2)</sup> H. Wiener, Arch. f. exper. Pathol. u. Pharmakol. 40. 315. 1898.

<sup>3)</sup> H. Kronecker, Arch. f. exper. Pathol. u. Pharmak. 16. 344. 1882.

<sup>4)</sup> R. Cohn, Festschrift für M. Jaffe, Braunschweig 1901. S. 327.



2. Methoden, bei welchen die aus Hippursäure abgespaltene Benzoessäure mit Wasserdampf abdestilliert wird.

a) Methode von Pfeiffer, Bloch und Riecke<sup>1)</sup>.

A. Prinzip. Die Hippursäure wird im Harn ohne vorherige Isolierung durch Erhitzen mit Schwefelsäure gespalten und die freigemachte Benzoessäure mit Wasserdämpfen übergetrieben. Das Destillat wird neutralisiert, auf 50 ccm eingengt, mit 10 ccm titrierter Schwefelsäure angesäuert und zur Krystallisation 48 Stunden im Eisschrank stehen gelassen. Nach Ablesen der Temperatur im Eisschrank wird von der abgeschiedenen Benzoessäure abfiltriert und ein aliquoter Teil des Filtrats mit Natronlauge titriert. Aus der verbrauchten Lauge lässt sich unter Berücksichtigung der verwandten Volumina berechnen, wieviel Schwefelsäure zur Abscheidung der abfiltrierten Benzoessäure verbraucht wurde, woraus die Menge der abgeschiedenen Benzoessäure bzw. die dieser entsprechende Menge Hippursäure berechnet werden kann. Für die in Lösung gebliebene Benzoessäure ist je nach der Temperatur des Eisschranks ein Korrektionsposten hinzu zu addieren.

B. Ausführung. Der ca. 700 ccm fassende Destillationskolben wird durch einen Kugelaufsatz mit dem Kühler verbunden, der am unteren Ende zur Vermeidung eines etwaigen Verspritzens der oft stossweise überdestillierten festen Benzoessäure mit einem gebogenen Glasstutzen versehen ist; letzterer ragt während der Destillation in einen graduirten, 500 ccm fassenden Zylinder. In den Destillationskolben ragt eine Hahnpipette, die bei 30 ccm eine Marke trägt. Die Destillation erfolgt aus einem Roseschen Metallbade. Von dem zu untersuchenden Harn wird ein aliquoter Teil, der womöglich nicht wesentlich mehr als 1 g Hippursäure enthält, abgemessen und nach Zusatz von 45 ccm konzentrierter Schwefelsäure und einiger Siedesteinchen der Destillation unterworfen. Von diesem Flüssigkeitsgemisch wird zunächst ohne Ersatz des verdampften Wassers stets soviel abdestilliert, dass im Kolben 95 ccm zurückbleiben, also bei Anwendung von 100 ccm Harn 50 ccm, bei 200 ccm Harn 150 ccm usw. Nunmehr hat das Säuregemisch die zur leichten Verflüchtigung der Benzoessäure erforderliche Konzentration erreicht. Alsdann werden Zug um Zug je 30 ccm Wasser durch die Hahnpipette zugelassen und gleiche Mengen Flüssigkeit abdestilliert, welche Operation zehnmal wiederholt wird. Man erhält also bei Anwendung von 100 ccm Harn im ganzen 350 ccm Destillat, bei 150 ccm Harn 400 ccm Destillat usw.

<sup>1)</sup> Th. Pfeiffer, C. Bloch u. R. Riecke, Mitteil. d. landwirtsch. Instituts d. Univ. Breslau. 2. 273. 1902.

Der Destillationskolben wird hierauf gegen einen anderen, mit Alkohol beschickten ausgetauscht, und es erfolgt Reinigung des Destillationsrohrs durch Überdestillieren von 60—70 ccm Alkohol. Nach halbstündigem Durchleiten eines Wasserstoffstroms wird das Destillat unter Verwendung von Phenolphthalein als Indikator mit Natronlauge neutralisiert, soweit wie nötig eingedampft und in ein bis zur Marke 50 ccm gekröpftes, im ganzen etwa 80 ccm fassendes Messkölbchen übergespült. Die alsdann schwach rot gefärbte Flüssigkeit wird mit einigen Tropfen einer sehr verdünnten Salzsäure neutralisiert und zur Austreibung der Kohlensäure im Wasserbade erwärmt; tritt hierbei durch Zerlegung des Mononatriumcarbonats in der Wärme wieder Rotfärbung ein, so muss erneut etwas Salzsäure zugesetzt werden, bis bleibende Entfärbung stattfindet. Dieser Punkt ist leicht und sicher erkennbar. Nach dem Erkalten der Flüssigkeit wird bis zur Marke aufgefüllt, und es erfolgt aus einer in einem Stativ befestigten, mit zwei Marken und einem Zuflussrohr versehenen Pipette (Zeit des Nachlaufes gleichmässig berücksichtigen!) der Zusatz von 10 resp. bei dem Vorhandensein grösserer Mengen Hippursäure 20 ccm einer titrierten Schwefelsäure, von der 10 ccm 1,5—2,0 g Hippursäure entsprechen. Das Kölbchen bleibt 48 Stunden im Eisschranke stehen, dann wird sein Inhalt im Eisschranke nach Ablesen der dort herrschenden Temperatur durch ein trockenes Filter filtriert. Vom Filtrate wird, nachdem es Zimmertemperatur angenommen hat, ein aliquoter Teil abgemessen und titriert.

Die Berechnung gestaltet sich, wie folgendes Beispiel zeigt: Angewandte Harnmenge = 100 ccm. Eingedampftes Destillat = 50 ccm, versetzt mit 10 ccm titrierter Schwefelsäure. 10 ccm titrierte Schwefelsäure mögen 47,04 ccm Titrierlauge, 1 ccm Titrierlauge 0,0410 g Hippursäure entsprechen. Diese jeweiligen Wirkungswerte sind besonders sorgfältig zu ermitteln. Temperatur im Eisschrank: 8,5°. Vom Filtrate 40 ccm abgemessen und titriert; verbraucht bei zwei Bestimmungen 18,05, 18,13, im Mittel 18,09 ccm Titrierlauge. Da nur  $\frac{2}{3}$  der Gesamtflüssigkeit ( $\frac{40}{60}$ ) titriert wurden, so berechnet sich für die Gesamtflüssigkeit ein Verbrauch von  $\frac{18,09 \cdot 3}{2} = 27,13$  ccm Lauge zur Rücktitration. Vorgelegt waren 10 ccm Säure, entsprechend 47,04 ccm Titrierlauge. Die Differenz 47,04—27,13 = 19,91 ccm Titrierlauge entspricht also der abgeschiedenen Menge Benzoesäure und ist durch Multiplikation mit dem Faktor 0,0410 umzurechnen auf 0,8163 g Hippursäure. Nach der weiter unten folgenden Tabelle I bleibt in 60 ccm Flüssigkeit bei 8,5° eine 0,1806 g Hippursäure entsprechende Menge Benzoesäure gelöst, so dass sich im ganzen ein Gehalt von  $0,8163 + 0,1806 = 0,9969$  g Hippursäure

in 100 ccm Harn ergibt. Sollte wesentlich mehr als 1 g Hippursäure gefunden werden, so ist von der in Tabelle II angegebenen Korrektur Gebrauch zu machen.

Die Methode von Pfeiffer, Bloch und Riecke gibt bei Pflanzenfresserharn mit hohem Hippursäuregehalt, z. B. beim Hammel, sehr gute Werte. Ihre Schwäche liegt darin, dass selbst bei einem Harn, der 1% Hippursäure enthält, der aus dem Lösungskoeffizienten berechnete Wert etwa 18–20% des Gesamtwertes ausmacht. Diese Werte sind aber für reines Wasser berechnet, während das Harndestillat noch andere Bestandteile, die auf die Löslichkeit der Benzoesäure von Einfluss sein können, enthält. Auch ist zu bedenken, dass bei Harnen, die reich an Phenacetursäure sind (s. nächstes Kapitel), Phenylelessäure sich mit der Benzoesäure zusammen ausscheiden kann.

Tabelle I.

### Lösungskoeffizienten der Benzoesäure, berechnet auf Hippursäure.

Temperatur °C	In 1000 Teilen Wasser sind gelöst		In 60 ccm Flüssigkeit = Hippursäure g
	Benzoesäure Teile	umgerechnet auf Hippursäure Teile	
4,5	1,823	2,674	0,1604
5,0	1,850	2,714	0,1628
5,5	1,878	2,755	0,1658
6,0	1,906	2,796	0,1677
6,5	1,934	2,837	0,1702
7,0	1,963	2,880	0,1728
7,5	1,993	2,924	0,1754
8,0	2,022	2,966	0,1779
8,5	2,052	3,010	0,1806
9,0	2,083	3,056	0,1834
9,5	2,114	3,101	0,1861
10,0	2,146	3,148	0,1889
10,5	2,178	3,195	0,1917
11,0	2,211	3,244	0,1946
11,5	2,244	3,292	0,1975
12,0	2,278	3,342	0,2005
12,5	2,312	3,392	0,2035
13,0	2,346	3,442	0,2065
13,5	2,381	3,493	0,2096
14,0	2,417	3,546	0,2128
14,5	2,453	3,599	0,2159
15,0	2,490	3,653	0,2192
15,5	2,527	3,707	0,2224
16,0	2,565	3,763	0,2258
16,5	2,604	3,820	0,2292
17,0	2,644	3,879	0,2327
17,5	2,684	3,937	0,2362

Tabelle II.

## Korrektur für wechselnden Hippursäuregehalt.

Wenn die Gesamtmenge der zu bestimmenden Hippursäure annähernd beträgt g	so sind bei der Destil- lation von 360 cem an- nähernd zu erwarten %
1,00	100,00
1,25	99,17
1,50	98,34
1,75	98,00
2,00	97,66
2,25	97,32

Bei menschlichen Urinen soll die Methode nach Schmid<sup>1)</sup> ein Defizit von etwa 10% geben.

b) Methode von Wiechowski<sup>2)</sup>.

A. Prinzip. Vom alkoholischen Harnextrakt wird ein aliquoter Teil mit Natronlauge gespalten. Die alkalische Lösung wird mit Phosphorsäure angesäuert und im Dampfstrom destilliert. Das in Sodalösung aufgefangene Destillat wird nach dem Eindampfen bis fast zur Trockne mit Salzsäure angesäuert und die Benzoesäure mit Petroläther ausgeschüttelt. Man erhält so den Gesamtwert für freie und abgespaltene Benzoesäure.

Zur getrennten Bestimmung der freien und (in Form von Hippursäure bzw. Benzoeglycuronsäure) gebundenen Benzoesäure verfährt Wiechowski folgendermassen:

Ein aliquoter Teil des alkoholischen Harnextraktes wird in wenig Wasser aufgenommen, mit Salzsäure angesäuert und mit Petroläther ausgeschüttelt. Die Petrolätherauszüge werden mit Barytwasser geschüttelt, und die barytalkalische Lösung zur Entfernung von Fettsäuren oder anderen Verunreinigungen, die mit Baryt ausfallen, vom entstandenen Niederschlag filtriert, und ebenso auf Benzoesäure verarbeitet wie oben die natronalkalische Lösung.

Die von der präformierten Benzoesäure durch Petroläther befreite Lösung wird mit Essigäther erschöpfend ausgeschüttelt, der Essigäther bei 30° verdunstet, der Rückstand mit Natronlauge gespalten

<sup>1)</sup> J. Schmid, Zentralbl. f. inn. Med. 25. 81. 1905.

<sup>2)</sup> W. Wiechowski, Hofmeisters Beiträge 7. 265. 1905.



und die frei gemachte Benzoessäure wie oben die Gesamt-Benzoessäure bestimmt.

B. Ausführung. Der (stets sauer reagierende) Harn wird mit Natriumcarbonat eben deutlich alkalisch gemacht, auf dem Wasserbade zum Sirup eingedampft, mit Alkohol (die letzten Spuren mit Wasser) in einen Messkolben von geeigneter Grösse gespült, Alkohol bis fast zur Marke nachgegossen und 24 Stunden stehen gelassen, hierauf bis zur Marke aufgefüllt, durchgeschüttelt, rasch filtriert und vom Filtrate ein aliquoter Teil, der der Wahrscheinlichkeit nach nicht mehr als 0,3—0,4 Gesamtbenzoessäure enthält, mit Pipetten in Stöpselflaschen von entsprechendem Inhalt (bzw. Hartglaskolben) abgefüllt. Der Alkohol dieser Extrakteile wird auf dem Wasserbade unter Zuhilfenahme eines Luftstromes, der über den Flüssigkeitsspiegel gesaugt oder geblasen wird, entfernt und der Rückstand in möglichst wenig Wasser (meist 5 ccm) gelöst.

Das weitere Vorgehen ist verschieden, je nachdem die Gesamtbenzoessäure des Harnes oder Benzoessäure und Hippursäure gesondert bestimmt werden sollen.

Im ersteren Falle wird die wässrige Lösung unter Zusatz von starker Lauge mehrere Stunden unter Rückfluss gekocht (I), im letzteren Falle wird mit Salzsäure angesäuert und zunächst die freie Benzoessäure 5 mal mit je 20 ccm Petroläther (Siedetemperatur 30—60°) ausgeschüttelt. Die einzelnen Petrolätherportionen werden mittels eines am unteren Ende aufgebogenen Heberchens, welches nebst einem Mundstück (nach Art einer Spritzflasche) in einen passenden Korkstopfen montiert ist, durch ein trockenes Filter in einen Schütteltrichter abgelassen. (Extraktionsflasche, Filter und Schütteltrichter sind hierbei übereinander an einem Universalgestell befestigt. Durch Anblasen des Mundstückes der Extraktionsflasche bringt man leicht die Flüssigkeit durch den Heber zum Ausfliessen und schiebt diesen dann vorsichtig abwärts, bis sein aufgebogenes abgeschmolzenes Ende eben mit der Trennungsfläche zwischen Petroläther und wässriger Schicht abschneidet. Die geringen Mengen Extrakt, die jedesmal in der Spitze des Hebers zurückbleiben, lassen sich leicht durch Ansaugen oder Ausblasen in die Flasche oder auf das Filter bringen. Nach jeder Extraktion werden alle Teile mit Petroläther abgespült.) Dann wird das Petrolätherextrakt 5 mal mit Barythydratlösung ausgeschüttelt, wobei meist eine flockige Fällung erfolgt, die Barytportionen in einen Hartglaskolben filtriert, Filter und Schütteltrichter nachgewaschen (II). Das bei dieser Manipulation ausfallende Baryumcarbonat stört in keiner Weise.

Die nach der Benzoessäureausschüttelung in der Extraktionsflasche zurückgebliebene, von ausgeschiedener Hippursäure mehr oder minder trübe Flüssigkeit wird hierauf 5 mal mit Essigäther ausgeschüttelt und die Extrakte mittels des Hebers durch dasselbe Filter, welches zur Filtration des benzoessäurehaltigen Petroläthers gedient hat, in derselben Weise in eine Porzellanschale abgelassen. Hierbei gilt als Regel, das erste Mal solange und mit soviel Essigäther zu schütteln, dass die ganze ausgeschiedene Hippursäure gelöst und die wässrige Schicht klar wird. Leichte Trübungen der Ätherschicht (infolge partieller Emulsionierung) lassen sich stets durch wenige Tropfen Alkohol beseitigen. Die vereinigten Extrakte werden an einem warmen Orte (30°) der Selbstverdunstung überlassen, die Rückstände mit starker Lauge in einen Hartglaskolben gespült und wie I verseift (III). — Dieser Teil der Bestimmung geht rasch vonstatten, die drei Ausschüttelungen beanspruchen kaum mehr Zeit als 1 Stunde. Das Abdunsten des Essigäthers dauert dagegen meist 12 Stunden. Es resultieren schliesslich drei Benzoessäurelösungen: I. Gesamtbenzoessäure; II. freie Benzoessäure; III. gebundene Benzoessäure. Sie werden mit Phosphorsäure angesäuert und der Dampfstromdestillation unterworfen, indem 2 Liter Wasser unter normalem Drucke durchdestilliert werden. Das Destillat tropft durch ein Filterchen in eine entsprechende Menge Natriumcarbonatlösung. Nachdem die alkalisch reagierenden Destillate in Schalen bis fast zur Trockne eingedampft sind, wird abermals in Extraktionsflaschen gespült und in derselben Weise wie früher dreimal mit Petroläther ausgezogen. Die Extrakte werden in gewogene Kölbchen filtriert, der Petroläther durch einen (mit Schwefelsäure) getrockneten Luftstrom bei Zimmertemperatur entfernt und die zurückbleibende, tadellos weisse Benzoessäure gewogen. Bei der Leichtflüchtigkeit der Benzoessäure ist es nur erwünscht, dass während des Blasens die Temperatur des Petroläthers bis unter 0° sinkt, so dass sich die Wände der Kolben mit einer Eiskruste bedecken. Die zurückbleibende Benzoessäure pflegt, sobald der Geruch nach Petroläther verschwunden ist, gewichtskonstant zu sein; andernfalls wird noch 10—15 Minuten trockene Luft durchgeleitet, oder die Kolben werden im Exsiccator getrocknet. Die erhaltenen Benzoesäurewerte werden unter Vernachlässigung des Volums der alkoholunlöslichen Harnbestandteile auf die Gesamtharnmenge umgerechnet.

Die Fehler der Methode liegen nach den Kontrollanalysen in den Milligrammen. Mit Berücksichtigung der Vergrößerung der Fehler durch das Umrechnen auf die Gesamt-Harnmenge nimmt *Wiechowski* als Fehlergrenze die Zahl von  $\pm 0,02$  g Benzoessäure an.

c) Methode von Seo<sup>1)</sup>.

Zur Bestimmung der präformierten Benzoesäure wird der mit Soda alkalisch gemachte Urin bis zur Sirupkonsistenz abgedampft und mit Alkohol extrahiert. Der Rückstand des Extrakts wird in möglichst wenig Wasser aufgenommen, mit Phosphorsäure angesäuert und mit Petroläther erschöpfend ausgeschüttelt.

Zur Bestimmung der Gesamt-Benzoesäure wird die zu untersuchende Harnportion mit 45 ccm konzentrierter Schwefelsäure in einen Kolben gebracht und wie bei Verfahren 2. a) abdestilliert, bis nur noch 95 ccm Flüssigkeit im Kolben übrig sind, dann werden durch ein in den Kolben eingeführtes, bis zum Boden reichendes, mit einem Glashahn verschliessbares Trichterrohr 30 ccm Wasser allmählich nachgefüllt und weiter abdestilliert, bis wieder 95 ccm übrig sind. Zufügung und Destillation von je 30 ccm Wasser wird im ganzen 10 mal wiederholt. Das gesamte Destillat wird mit Natriumcarbonat schwach alkalisch gemacht und auf dem Wasserbad bis auf wenige ccm eingengt, in ein Kölbchen gebracht, mit Phosphorsäure angesäuert, wobei oft schon Benzoesäure ausfällt, und erschöpfend mit Petroläther ausgeschüttelt.

Bei der Ausschüttelung wird die erste Petrolätherportion zunächst in ein Kölbchen abgegossen, mit etwas Wasser gewaschen, dann erst in eine Glasschale abgegossen; jede folgende Petrolätherportion wird unter Verwendung desselben Waschwassers in demselben Kölbchen gewaschen, um einen Verlust an Benzoesäure beim Auswaschen zu vermeiden.

Die Petrolätherrückstände werden nach dem spontanen Abdünsten gewogen.

In drei Kontrollanalysen gab das Verfahren recht befriedigende Resultate.

3. Bestimmung der Gesamt-Benzoesäure nach Folin und Flanders<sup>2)</sup>.

A. Prinzip. Die Hippursäure wird durch Erhitzen des Harns mit Salpetersäure unter Zusatz von Kupfernitrat gespalten, die gebildete Benzoesäure mit Chloroform extrahiert und in der gewaschenen Chloroformlösung mit Natriumalkoholatlösung titriert. Dass die Spaltung von Hippursäure unter den unten beschriebenen Bedingungen quantitativ erfolgt, ist durch Kontrollversuche festgestellt.

<sup>1)</sup> Y. Seo, Arch. f. exper. Pathol. u. Pharmakol. 58. 442. 1908.

<sup>2)</sup> O. Folin und F. F. Flanders, Journ. of biol. chem. 11. 257. 1912.

B. Ausführung. 100 ccm Harn werden in eine Porzellanschale abpipettiert und unter Zusatz von 10 ccm 5%iger Natronlauge auf dem Dampfbad zur Trockne verdampft. Der Rückstand wird mit 25 ccm Wasser und 25 ccm konzentrierter Salpetersäure in einen 500 ccm fassenden Kjeldahl-Kolben gebracht und nach Zusatz von 0,2 g Kupfernitrat und einiger Glasperlen  $4\frac{1}{2}$  Stunden über einem Mikrobrenner in gelindem Sieden erhalten. Der Kolbenhals wird mit einem Hopkinschen Kühler verschlossen, d. i. ein lose aufsitzendes weites Reagenzglas, in welchem Wasser zirkuliert; das Glas ist mit einem doppelt durchbohrten Stopfen verschlossen, durch dessen eine Bohrung ein bis auf den Boden reichendes Zuflussrohr, durch dessen andere ein unter dem Stopfen abschliessendes Abflussrohr geführt wird. Bei genügendem Wasserdurchfluss geht weder Benzoesäure während des Kochens verloren, noch ändert sich die Konzentration der Salpetersäure im Kolben.

Wenn die Kolben kühl geworden sind, spült man die Kühler mit 25 ccm Wasser ab, bringt den Kolbeninhalt in einen 500 ccm fassenden Scheidetrichter und spült mit 25 ccm Wasser nach, so dass das Gesamtvolum 100 ccm beträgt. Zu der Flüssigkeit fügt man festes Ammoniumsulfat bis zur Sättigung (etwa 55 g) und schüttelt viermal mit gut gewaschenem Chloroform aus, erst mit 50, dann mit 35, zuletzt zweimal mit je 25 ccm. Mit den beiden ersten Chloroformportionen spült man zuerst den Kjeldahl-Kolben nochmals aus. Der Scheidetrichter darf kräftig geschüttelt werden, da Emulsionsbildung nicht einzutreten pflegt.

Die Chloroform-Ausschüttelungen werden in einem zweiten Scheidetrichter gesammelt und mit 100 ccm gesättigter Kochsalzlösung, die auf den Liter 0,5 ccm konzentrierte Salzsäure enthält, geschüttelt. Die Chloroformlösung wird dann in einen trocknen, 500 ccm fassenden Erlenmeyer-Kolben gebracht und mit  $n/_{10}$ -Natriumalkoholatlösung unter Anwendung von 4—5 Tropfen Phenolphthalein als Indikator titriert. Die erste deutliche, wenn auch beim Stehen schnell verschwindende Rotfärbung bezeichnet die Endreaktion.

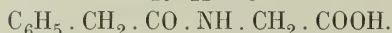
Die Natriumäthylatlösung wird durch Auflösung von 2,3 g reinem Natrium in 1 Liter absoluten Alkohols dargestellt. Sie soll eher etwas schwächer als stärker als zehntel-normal sein und wird am besten auf eine Lösung von reiner Benzoesäure in reinem Chloroform eingestellt.

Die Bestimmungen der Hippursäure in normalen Harnen gaben den Autoren gute Übereinstimmung bei Doppelanalysen; Kontrollanalysen mit Hippursäurezusatz sind nicht angeführt.



V. Bestimmung der Benzoesäure, Hippursäure und Phenacetursäure nach Steenbock s. S. 840.

Phenacetursäure.



Die Säure wurde synthetisch von Hotter<sup>1)</sup> durch Einwirkung von Phenylessigsäurechlorid auf Glycocoll in alkalischer Lösung bei niedriger Temperatur erhalten.



A. Vorkommen. Sie ist zuerst von E. Salkowski im Harn des Pferdes aufgefunden worden und findet sich da regelmässig in kleiner Menge (0,8 g im Liter gefunden), auch kommt sie zeitweilig im Harn des Menschen vor. Sie stammt von der bei der Fäulnis von Eiweiss im Darm entstehenden Phenylessigsäure ( $\alpha$ -Toluylsäure) ab; nach Verabreichung dieser Säure an Hunde und Kaninchen findet sie sich nach E. und H. Salkowski in reichlicher Menge im Harne vor; Knoop<sup>2)</sup> konnte diesen Befund bestätigen. Hotter dagegen vermisste die Phenacetursäure im Harne von Menschen, welche mehrere Tage hintereinander täglich 3 g Phenylessigsäure genommen hatten.

Haralamb fand beim Hammel nach sehr eiweissreicher Kost 5,6 g Phenacetursäure in der täglichen Harnmenge. Vom Phenylalaninkomplex der Eiweisskörper sollen bei Pflanzenfressern 40% als Hippursäure, 60% als Phenacetursäure im Harn erscheinen. Steenbock<sup>3)</sup> dagegen vermisste die Phenacetursäure im Kuhharn ganz.

B. Eigenschaften. 1. Wenn die Phenacetursäure langsam aus wässriger Lösung krystallisiert, so bildet sie harte, kleine, aus dicken rhombischen Tafeln mit abgerundeten Winkeln bestehende Krystalle, die manchen Harnsäureformen ähnlich sind, oder dicke, anscheinend rechtwinklige Prismen mit zweiflächiger Zuspitzung. Aus heissem Wasser krystallisiert sie in dünnen, dicht aufeinander liegenden Plättchen, aus Alkohol und Essigäther nach Hotter<sup>4)</sup> in würfelähnlichen Krystallen. Sie löst sich in 136 Teilen Wasser von 11–12°, also leichter als Hippursäure, leichter in heissem als in kaltem Wasser, schwer in heissem Benzol, ziemlich schwer in heissem Chloroform,

<sup>1)</sup> E. Hotter, Journ. f. prakt. Ch. [2] 38. 117. 1888.

<sup>2)</sup> E. Salkowski, Berichte d. chem. Gesellsch. 17. 3310. 1884; Ztschr. f. physiol. Ch. 9. 229 u. 501. 1885. — E. u. H. Salkowski, Berichte d. chem. Gesellsch. 12. 653. 1879; Ztschr. f. physiol. Ch. 7. 162. 1882/83. — F. Knoop, Hofmeisters Beiträge 7. 154. 1905.

<sup>3)</sup> Haralamb V., Mitt. d. landw. Inst. d. Univ. Breslau. 1909. 703. — H. Steenbock, Journ. of biol. chem. 11. 201. 1912.

<sup>4)</sup> E. Hotter, a. a. O. 97.



C. Darstellung. Aus Pferdeharn gewinnt man die Phenacetursäure nach E. Salkowskis letzter Vorschrift in folgender Weise.

Es wird 1 l Harn auf 200 ccm eingedampft, der Rückstand in 800 ccm Alkohol von 95% gelöst, das Filtrat verdunstet, und die wässrige Lösung des Rückstandes stark mit Salzsäure angesäuert. Nachdem die nach einigem Stehen etwa ausgefallene Hippursäure abfiltriert worden ist, wird die Flüssigkeit wiederholt mit alkoholhaltigem Äther (wohl besser Essigäther) ausgeschüttelt, der ätherischen Lösung die Säure durch Schütteln mit überschüssiger Sodalösung entzogen und diese dann nach dem Ansäuern mit Salzsäure wieder mit Äther ausgeschüttelt; der beim Abdestillieren des Äthers zurückbleibende Sirup wird mit 50–80 ccm Wasser zum Sieden erhitzt, die Lösung nach 24 Stunden abfiltriert, auf 15 ccm eingedampft und der Krystallisation überlassen. Die Krystalle werden durch Abpressen zwischen Tonplatten von anhaftender schmieriger Substanz befreit und aus heissem Wasser unter Zusatz von Tierkohle umkrystallisiert. Von etwa beigemengter Hippursäure lassen sich die Krystalle durch Schlämmen, von beigemengter Benzoesäure durch Äther befreien.

In gleicher Weise kann die Phenacetursäure aus Menschenharn erhalten werden.

D. Nachweis. Erkannt wird die Phenacetursäure an ihrer Krystallform und an ihrem Schmelzpunkt. Beim Überhitzen verhält sie sich wie die Hippursäure. Auch die Überführung in das Lactimid (B. 6) kann zur Identifikation benutzt werden.

#### E. Bestimmung der Hippursäure und Phenacetursäure nach Steenbock<sup>1)</sup>.

1. Prinzip. Die Spaltung der Hippursäure erfolgt durch Kochen mit Natronlauge unter Zusatz von Wasserstoffsuperoxyd, das die Farbstoffe des Harns oxydiert. Aus der angesäuerten Lösung werden Phenole durch Zusatz von Bromwasser entfernt, ein aliquoter Teil abfiltriert und mit Äther ausgeschüttelt. Die aus dem Äther durch Verdunsten gewonnene Benzoesäure wird durch Sublimation gereinigt und gewogen. Das Gewicht wird durch Titration kontrolliert. Ist der Titrationswert geringer als das Gewicht, so wird dies auf eine Beimengung von Phenyl-essigsäure (aus Phenacetursäure) bezogen, deren Menge aus dem Gewicht des Sublimats und dem Titrationswert berechnet werden kann.

2. Ausführung. In einem Halbliter-Kolben werden 100 ccm Urin zwei Stunden lang über kleiner Flamme mit 10 g Ätznatron und 25 ccm Wasserstoffsuperoxyd, welch letztere in kleineren Einzelportionen zugesetzt werden, gekocht. Nach dem Abkühlen wird die Lösung in einen 200 ccm-Messkolben gebracht und mit 50%iger Schwefelsäure schwach gegen Lackmus angesäuert. Dann wird Bromwasser zugefügt, bis ein schwacher Bromgeruch bleibt, die Lösung bis auf 200 ccm aufgefüllt und durch ein trocknes Filter filtriert. 50 ccm des klaren Filtrats werden nach Ansäuern (Kongoreaktion) mit Äther fünfmal ausgeschüttelt und die Ätherlösung zur Sublimation der Benzoesäure folgendermassen behandelt.

<sup>1)</sup> H. Steenbock, Journ. of biol. chem. 11, 201. 1912.

Man lässt die Ätherlösung im Scheidetrichter stehen, bis sich die letzten Spuren von Wasser abgesetzt haben und trennt diese ab. Dann lässt man die Ätherlösung Tropfen für Tropfen in ein in einem Wasserbad von 40° befindliches U-Rohr laufen, durch das ein trockner Luftstrom mit der Pumpe durchgesaugt wird. Ist der Äther verdunstet und die Benzoessäure vollkommen trocken, was bei der Temperatur von 40° schnell erreicht wird, so wird sie durch Sublimation gereinigt: Das U-Rohr wird in ein Luftbad gehängt, der eine Schenkel mit einer Schwefelsäure enthaltenden Waschflasche, der andere mit einem gewogenen Kondensationsrohr durch einen schmalen Kork verbunden. Das Kondensationsrohr besteht aus einem leichten Glasrohr (ca. 20 g) von 25 cm Länge und 9 mm lichter Weite, das zu 3 Kugeln von 3 cm Durchmesser mit 9 mm Abstand aufgeblasen ist. Die Kugeln sind mit Glaswolle gefüllt. Durch den Apparat wird ein trockner Luftstrom gesaugt und das Luftbad allmählich auf 130° erhitzt. Die Benzoessäure sublimiert ungefähr innerhalb einer Stunde in das Kondensationsrohr, das man nach Vollendung der Sublimation im Exsiccator abkühlen lässt und wägt.

Das Sublimat wird mit  $n/_{20}$ -Natronlauge unter Anwendung von Phenolphthalein als Indikator titriert und so die gefundene Benzoessäure kontrolliert. Ist der Titrationswert geringer als dem Gewicht des Sublimats entspricht, so war der Benzoessäure Phenylelessigsäure beigemischt, deren Molekulargewicht um  $\text{CH}_2$  grösser ist als das der Benzoessäure. Ihre Menge kann nach folgender Formel berechnet werden:

$$\left[ \text{Gewicht des Sublimats} - \left( \text{ccm } \frac{20}{n} \text{ NaOH} \cdot \text{g Benzoessäure in 1 ccm } \frac{n}{20} \text{ Lösung} \right) \right] : x = \text{CH}_2 : \text{C}_6 \text{H}_5 \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{COOH}$$

$x$  = Gewicht der Phenylelessigsäure.

Gewicht des Sublimats  $- x$  = Gewicht der Benzoessäure.

Beispiel einer Berechnung: Das Gewicht des Sublimats betrug 0,370 g, zur Titration wurden verbraucht 57,75 ccm  $n/_{20}$ -NaOH. 1 ccm  $n/_{20}$ -Lauge entspricht 0,006 g Benzoessäure. Daraus berechnet sich nach der obigen Formel

$$\begin{aligned} [0,3700 - (57,75 \cdot 0,006)] : x &= 14 : 136 \\ 0,0177 : x &= 14 : 136 \\ x &= 0,1719 \end{aligned}$$

Gefunden 0,1719 g Phenylelessigsäure und  $0,37 - 0,1719 = 0,1981$  g Benzoessäure.

Die von Steenbock ausgeführten Kontrollanalysen mit Zusatz von Hippursäure und Phenacetursäure gaben gute Resultate. Aber Steenbock weist selbst auf eine Schwäche der Methode hin, die sich geltend macht, sobald ein Gemenge von Benzoessäure und Phenyl-



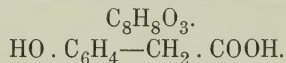
essigsäure vorliegt: Eine Abweichung von 0,1 ccm  $n/_{20}$ -NaOH bedingt nach der obigen Berechnung nämlich eine Differenz von 0,0068 g Phenylelessigsäure bzw.  $0,0068 \cdot 1,4191 = 0,0096$  g Phenacetursäure. Wenn also geringe Verunreinigungen mit in das Sublimat gehen, werden die Endresultate stark beeinflusst.

### Aromatische Oxysäuren.

Von aromatischen Oxysäuren, die Hydroxyl am Benzolkern enthalten, hat Baumann im normalen Harn zwei, die Paraoxyphenylelessigsäure und die Paraoxyphenylpropionsäure entdeckt; sie finden sich ausnahmslos im Harn des Menschen, Pferdes, Hundes, Kaninchens, auch im Harn der Hühner in geringer Menge. Sie entstehen bei der Fäulnis des Eiweisses im Darm oder auch in den Geweben (Baumann). Dass sie nicht nur bei der Darmfäulnis entstehen, ergibt sich nach Baumann daraus, dass auch bei Unterdrückung der Darmfäulnis Oxysäuren, wenn auch in geringerer Menge, im Harn noch ausgeschieden werden, während die Phenolschwefelsäuren vollständig verschwinden. Auch im Harn von Tieren mit sterilem Darm finden sie sich nach Nuttall und Thierfelder, während die Phenole fehlen. Im Liter normalen Menschenharns sind ungefähr 0,01 bis 0,02 g derselben enthalten (Baumann, Magnus-Levy). An Phenol reiche, pathologische Harne enthalten 2—8 mal so viel von diesen Oxysäuren, namentlich reich daran ist der Harn bei der akuten Phosphorvergiftung, sowie nach Blendermann<sup>1)</sup> nach der Verfütterung von Tyrosin. Diese Oxysäuren kommen grossenteils als solche im Harn vor, ein kleinerer Teil aber auch als Ätherschwefelsäure. Ferner gehören hierher die Oxyphenylmilchsäure, welche bei Phosphorvergiftung und nach Tyrosinfütterung gefunden wurde; die Gallussäure als zeitweiliger Bestandteil des Pferdeharns und die Homogentisinsäure.

## I. Die Oxysäuren des normalen Harns.

### 1. Paraoxyphenylelessigsäure.



A. Eigenschaften. Die Eigenschaften der Paraoxyphenylelessigsäure sind von H. und E. Salkowski<sup>2)</sup>, sowie von Baumann ermittelt worden.

<sup>1)</sup> E. Baumann, Ber. d. chem. Gesellsch. **12**. 1450; **13**. 279; Zeitschr. f. physiol. Ch. **4**. 304 u. 307.; **10**. 126. — G. H. F. Nuttall u. H. Thierfelder, Ztschr. f. physiol. Ch. **22**. 73. 1896. — A. Magnus-Levy, Festschr. f. E. Salkowski, S. 253. Berlin 1904. — Blendermann, Ztschr. f. physiol. Ch. **6**. 247.

<sup>2)</sup> H. Salkowski, Ber. d. chem. Gesellsch. **12**. 1438. — E. Salkowski und H. Salkowski, ebenda. **12**. 650. 1879.

1. Sie krystallisiert aus kaltem Wasser in farblosen, prismatischen, meist flachen, äusserst spröden Nadeln, oder in derben glasglänzenden Prismen, schmilzt bei  $148^{\circ}$ , verflüchtigt sich bei stärkerem Erhitzen zum Teil unzersetzt und ist im Wasserdampfstrom nicht flüchtig.

2. Sie löst sich ziemlich leicht in kaltem Wasser, sehr leicht in heissem Wasser, weniger leicht in salzsäurehaltigem; sie löst sich ferner sehr leicht in Alkohol und in Äther, schwer in Benzol und scheidet sich beim Erkalten der heissen Benzollösung fast vollständig wieder ab. In Wasser und in siedendem Benzol löst sie sich etwas schwerer als die p-Oxyphenylpropionsäure.

3. Ihre Alkalisalze sind in Wasser leicht löslich; das Ammonsalz krystallisiert in langen feinen Nadeln. Das Kalksalz  $(C_8H_7O_3)_2Ca + 4 H_2O$  scheidet sich aus seiner stark konzentrierten Lösung in durchsichtigen, tafelförmigen Krystallen ab. Das Barytsalz krystallisiert beim schnellen Erkalten der konzentrierten Lösung in feinen Nadeln. — Mit Kupfer-, Zink- und Cadmiumsalzen gibt die Lösung des Ammonsalzes amorphe weisse, sich im Licht färbende Niederschläge, die sich in viel siedendem Wasser lösen und aus der Lösung theils amorph, theils in mikroskopischen Nadeln wieder ausfallen; das Silbersalz hat die Zusammensetzung  $C_8H_7AgO_3$ . — Ein eigenthümliches Verhalten zeigt das Bleisalz. Essigsäures Blei gibt mit sehr verdünnten Lösungen des Ammonsalzes anfangs keinen Niederschlag, aus konzentrierten Lösungen dagegen fällt ein dichtes, körnig-krystallinisches Salz aus, das sich in überschüssiger Bleizuckerlösung löst, sich aber aus dieser Lösung wieder allmählich abscheidet. Der Niederschlag löst sich in viel siedendem Wasser, und aus dieser Lösung setzt sich ein Salz  $(C_8H_7O_3)_2Pb$  in trüben, etwas gelblich grauen, harten Krystallkörnern ab, (kleine Drusen). Dasselbe Salz scheidet sich auch aus den anfangs klar gebliebenen Mischungen ab. Bei längerem Stehen der Lösung bilden sich ausserdem noch durchsichtige bräunlichgelbe, glänzende Krystalle,  $(C_8H_7O_3)_2Pb + 2 H_2O$ , sämtlich Zwillinge, wie es scheint des triklinischen Systems.

4. Die wässrige Lösung der Säure färbt sich auf Zusatz von Eisenchlorid im ersten Augenblick grauviolett, darauf wenig intensiv schmutzigrün.

5. Beim Kochen mit salpetersaurem Quecksilberoxyd und salpetrigsaurem Kali färbt sich die Lösung intensiv rot (Millon'sche Reaktion).

6. Mit Bromwasser gibt sie einen sich langsam absetzenden Niederschlag.

7. Das Kalksalz liefert bei der Destillation mit Natronkalk Parakresol; dieselbe Zersetzung erleidet die Paraoxyphenylelessigsäure, wenn sie in verschlossenen Gefässen mit Pankreassaft in Fäulnis versetzt wird.

B. Darstellung der Oxyssäuren (I.). Nach Baumann<sup>1)</sup> werden grosse Mengen (50 Ltr.) frischen Harns zum dünnen Sirup verdunstet, stark mit Essigsäure angesäuert und mit Äther ausgezogen. Der Äther wird wiederholt mit überschüssiger Sodalösung geschüttelt, die alkalische Lösung angesäuert und wieder mit reinem Äther ausgeschüttelt. Vom ätherischen Auszug wird der Äther abdestilliert und die rückständige Lösung auf dem Wasserbade erwärmt, bis der grösste Teil der Essigsäure verjagt ist. Man löst in wenig Wasser, fällt mit neutralem

<sup>1)</sup> Baumann, Ztschr. f. physiol. Ch. 6. 191. 1882.

essigsäurem Blei aus und schlägt im Filtrate die Oxysäuren mit basisch essigsäurem Blei nieder. Der Niederschlag wird gewaschen, abgepresst, in Wasser verteilt, mit Schwefelwasserstoff zersetzt und die Lösung wieder mit Äther ausgezogen. Nach dem Verdunsten des Äthers hinterbleibt ein stark saurer gelber Sirup, der meist nach einiger Zeit krystallinisch erstarrt. Tritt auch nach längerem Stehen keine Krystallisation ein, so löst man den Sirup in Wasser, kocht die Lösung mit kohlen-säurem Baryt und scheidet aus der Lösung der Barytsalze die Säuren von neuem ab. Die Säuren aus Menschenharn erstarren stets nach einigen Tagen krystallinisch, die aus Hunde- und Pferdeharn krystallisieren schwieriger. Die Krystalle werden abgepresst und aus wenig Wasser umkrystallisiert. Die Paraoxyphenylessigsäure krystallisiert dabei in langen durchsichtigen Prismen und wird durch einmaliges Umkrystallisieren aus viel Benzol völlig rein erhalten. In der wässerigen Mutterlauge befindet sich neben der Oxyphenylpropionsäure ein Rest Paraoxyphenylessigsäure.

Magnus-Levy<sup>1)</sup> kürzt das Verfahren bis zur Fällung mit Bleiessig bzw. mit Bleiessig und Ammoniak in folgender Weise ab: 100 Liter frischer Menschenharn werden stark eingeeengt, mit Ammonsulfat gesättigt, filtriert und im Extraktionsapparat 8—16 Stunden mit Äther extrahiert. Der Ätherrückstand wird in Wasser aufgenommen, zur Entfernung von Verunreinigungen mit Bleiacetat gefällt und das Filtrat mit Bleiessig versetzt und nach Baumann weiter behandelt.

C. Nachweis. An diesen Oxysäuren (I.) reiche Harne geben nach Blendermann<sup>2)</sup> die Millonsche Reaktion (A. 5) schon in der Kälte und nach kurzer Zeit, während sie bei Gegenwart von viel Phenolen und Abwesenheit der Oxysäuren in der Kälte nur ganz allmählich auftritt. Eine sichere Überzeugung von der Gegenwart der Oxysäuren überhaupt kann man sich nach Baumann in folgender Weise verschaffen. Man erwärmt etwa 20 ccm Harn nach Zusatz von Salzsäure zur Vertreibung der flüchtigen Phenole einige Zeit im Wasserbad, zieht die Flüssigkeit nach dem Erkalten dreimal mit Äther aus, schüttelt den Auszug mit schwacher Sodalösung, welche die Oxysäuren aufnimmt, den Rest der Phenole aber im Äther lässt. Die alkalische Lösung wird darauf mit Schwefelsäure schwach angesäuert und abermals mit Äther ausgeschüttelt. Man verdunstet den abgehobenen Äther, löst den Rückstand in wenig Wasser und stellt mit dieser Lösung nach A. 5 die Millonsche Reaktion an. Eine Rotfärbung der Flüssigkeit zeigt die Oxysäuren an, und die Intensität derselben gestattet selbst, wenn man den Rückstand des letzten Ätherauszuges immer in derselben Menge Wasser löst, eine annähernde Schätzung des Gehalts des Harns an Oxysäuren. Etwa beigemengte Indolessigsäure beeinträchtigt die Reaktion nicht.

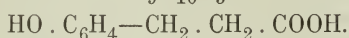
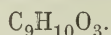
Um die Paraoxyphenylessigsäure selbst nachzuweisen, muss sie nach B. isoliert werden. Zur Erkennung derselben dient die Millonsche Reaktion, ihre Färbung durch Eisenchlorid, das charakteristische Verhalten ihres Bleisalzes und vor allem ihr Schmelzpunkt.

<sup>1)</sup> A. Magnus-Levy, Festschr. f. E. Salkowski, Berlin. 1904. S. 253.

<sup>2)</sup> Blendermann, Ztschr. f. physiol. Ch. 6. 245.



## 2. Paraoxyphenylpropionsäure.



Syn.: Hydroparacumarsäure.

A. Eigenschaften. 1. Nach den Untersuchungen von Hlasiwetz und Malin, Buchanan und Glaser und von Baumann <sup>1)</sup> krystallisiert die Oxyphenylpropionsäure in kleinen, wohlausgebildeten, monoklinischen Prismen, schmilzt bei 125<sup>0</sup>, destilliert in stärkerer Hitze, wie es scheint, unzersetzt, und ist mit Wasserdämpfen in Spuren flüchtig.

2. Sie löst sich leicht in Wasser, in Alkohol und in Äther; in Benzol löst sie sich schwer, scheidet sich aber beim Erkalten der Benzollösung langsamer und weniger vollständig wieder aus, wie die Paraoxyphenylessigsäure.

3. Ihre Alkalisalze sowie das Kalk- und Barytsalz sind in Wasser sehr leicht löslich; das Ammonsalz bildet eine strahlige Krystallmasse, das Barytsalz  $(\text{C}_9\text{H}_9\text{O}_3)_2\text{Ba}$  Krystallwarzen. — Die nicht zu verdünnte Lösung des Ammonsalzes gibt mit schwefelsaurem Zink einen krystallinischen Niederschlag, der nach dem Umkrystallisieren perlmutterglänzende Tafeln und Plättchen darstellt; das Salz besitzt die Zusammensetzung  $(\text{C}_9\text{H}_9\text{O}_3)_2\text{Zn} + 2 \text{H}_2\text{O}$  und löst sich in 130 Teilen kaltem Wasser, leichter in heissem. Die verdünnte wässrige Lösung scheidet bei längerem Erhitzen einen flockigen Niederschlag von basischem Salz ab. — Das Kupfersalz  $(\text{C}_9\text{H}_9\text{O}_3)_2\text{Cu} + 2 \text{H}_2\text{O}$  setzt sich auf Zusatz von Kupferchlorid zu einer nicht zu verdünnten Lösung eines Alkalisalzes der Säure nach einiger Zeit in dunkelgrünen, glänzenden, kurzen Prismen ab; es löst sich schwer in Wasser, scheidet beim Kochen schwarzes Kupferoxyd ab, reduziert aber Kupferoxyd in alkalischer Lösung nicht. — Das Silbersalz entsteht als weisser amorpher Niederschlag; es ist ziemlich leicht löslich; aus verdünnten oder warmen Lösungen scheidet es sich in sehr kleinen, platten Nadeln aus. — Auch salpetersaures Quecksilberoxydul gibt mit der Lösung eines Salzes der Säure einen weissen Niederschlag. — Essigsaures Blei erzeugt im Ammonsalz einen weissen krystallinischen Niederschlag, der sich in überschüssiger Bleizuckerlösung wieder löst, in Bleiessig dagegen fast nicht.

4. Eisenchlorid färbt die kalt gesättigte wässrige Lösung der Säure deutlich blau, die Flüssigkeit trübt sich milchig und setzt einen harzartigen Körper ab, während das Filtrat noch blau gefärbt erscheint. — Sie färbt sich bei der Millonschen Probe selbst in starker Verdünnung noch intensiv rot. — Bromwasser gibt in der Lösung eine milchige Trübung. — Die kalt gesättigte Lösung der Säure färbt sich mit einigen Tropfen konzentrierter Salpetersäure unter schwachem Erwärmen rot, trübt sich dann und scheidet in einigen Stunden schöne lange Nadeln einer Nitroverbindung ab, die sich in Ammoniak mit tief roter Farbe lösen.

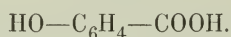
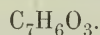
<sup>1)</sup> Hlasiwetz, Ann. d. Chem. u. Pharm. **142**. 358. 1867. — Buchanan u. Glaser, Ztschr. f. Ch. [2] **5**. 197. 1869. — Baumann, Ztschr. f. physiol. Ch. **4**. 305. 1880; Ber. d. chem. Gesellsch. **13**. 281.



B. Darstellung. Die Oxyphenylpropionsäure findet sich in der wässrigen Mutterlauge der Paraoxyphenylelessigsäure neben einem Rest dieser (s. I. 1. B.). Man verdampft sie zur Trockne und kocht den Rückstand mit einer zur völligen Lösung ungenügenden Menge Benzol. Beim Erkalten der Lösung krystallisiert die Oxyphenylpropionsäure noch gemengt mit Paraoxyphenylelessigsäure aus. Ein Verfahren zur Trennung beider Säuren ist noch nicht bekannt.

C. Nachweis. Der Nachweis der Paraoxyphenylpropionsäure gestaltet sich ähnlich dem der Paraoxyphenylelessigsäure; von dieser lässt sie sich am sichersten durch ihren Schmelzpunkt unterscheiden.

### 3. Paraoxybenzoesäure.



A. Vorkommen. Jaffe<sup>1)</sup> erwähnt gelegentlich ohne genauere Angaben über die Art der Identifikation, dass er aus normalem Pferdeharn p-Oxybenzoesäure erhalten habe.

Die Säure fand sich in einem Ätherextrakt, das aus 20 Liter Pferdeharn folgendermassen gewonnen war: Der Harn wurde mit Bleiacetat, das Filtrat vom entstandenen Niederschlag mit Bleiessig gefällt. Der abfiltrierte Niederschlag wurde mit Schwefelwasserstoff zersetzt und die Lösung erschöpfend mit Äther ausgeschüttelt. In diesem Ätherextrakt wurde die Säure neben Hippursäure, Phenacetursäure und Indolessigsäure nachgewiesen.

In grösseren Mengen wurde p-Oxybenzoesäure von Preusse aus dem Harn von Hunden nach Fütterung mit p-Kresol erhalten (1,5 g aus 15 g Kresol). Sie findet sich im Harn auch nach Verabreichung von p-Oxyphenylpropionsäure. p-Oxybenzoesäure selbst wird zum Teil unverändert, zum Teil an Glycocoll gebunden, zum Teil mit Schwefelsäure gepaart ausgeschieden. (Baumann und Herter<sup>2)</sup>).

B. Eigenschaften. 1. Die Säure krystallisiert mit 1 Mol. Wasser in monoklinen Prismen aus Wasser. Das Krystallwasser verliert sie bei 100° und schmilzt bei 210°. Sie ist leicht löslich in heissem Wasser, Alkohol und Äther, sehr wenig in Chloroform und Schwefelkohlenstoff.

2. Mit Eisenchlorid gibt die wässrige Lösung der Säure braune Färbung.

3. Bei raschem Erhitzen zerfällt sie in Phenol und Kohlensäure.

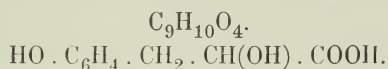
<sup>1)</sup> M. Jaffe, Arch. f. exper. Path. u. Pharmakol. Suppl. Bd. 1908. (Festschrift f. O. Schmiedeberg) S. 302.

<sup>2)</sup> C. Preusse, Ztschr. f. physiol. Ch. 5. 59. 1881. — E. u. H. Salkowski, ebenda 7. 176. 1883. — E. Baumann u. E. Herter, ebenda 1. 256. 1877.

4. Durch überschüssiges Bromwasser wird sie in Kohlensäure und Tribromphenol zerlegt.

5. Millons Reagens fällt aus konzentrierter wässriger Lösung einen weissen Niederschlag; beim Erhitzen tritt Rotfärbung ein.

## II. p-Oxyphenylmilchsäure.



Syn.: Oxyhydroparacumarsäure.

Die Säure ist durch Einwirkung von Baryumnitrit auf in Schwefelsäure gelöstes l-Tyrosin, Ausäthern des Reaktionsprodukts und Umkrystallisieren des Ätherrückstandes aus Wasser von Kotake<sup>1)</sup> dargestellt worden.

A. Vorkommen. Kotake isolierte die Verbindung aus dem Harn von Hunden, die mit Phosphor vergiftet waren, in Mengen von einigen Milligrammen bis etwa 0,2 g. Nach Beobachtungen von Baumann kommt beim Menschen im Harn nach Phosphorvergiftung eine Säure vom gleichen Schmelzpunkt und, soweit untersucht, gleichen Eigenschaften vor. Auch die von Blendermann<sup>2)</sup> nach reichlicher Tyrosinfütterung (3 bzw. 6 g) im Kaninchenharn einmal gefundene Säure scheint p-Oxyphenylmilchsäure zu sein. Nach kleineren Dosen (1–2 g Tyrosin) fand sie Kotake nicht.

B. Eigenschaften. 1. Die Säure krystallisiert aus Wasser in langen Nadeln vom Schmelzpunkt 167–168° (Kotake), bzw. 170 bis 171° (Schmitz)<sup>3)</sup>. Sie enthält  $\frac{1}{2}$  Mol. Krystallwasser. Die spezifische Drehung beträgt –18° (Kotake).

d-l-Oxyphenylmilchsäure, die bequem durch Reduktion von p-Oxyphenylbrenztraubensäure mit Natriumamalgam zu erhalten ist (Neubauer), krystallisiert ebenfalls mit  $\frac{1}{2}$  Mol. Wasser. Der Schmelzpunkt der racemischen Säure liegt sowohl für die wasserfreie wie für die wasserhaltige Säure bei 144° (Kotake). Eine von Erlenmeyer und Lipp<sup>4)</sup> aus racemischem Tyrosin mit salpetriger Säure erhaltene Säure, deren Analyse ebenfalls auf Oxyphenylmilchsäure stimmte, schmolz dagegen im wasserhaltigen Zustand bei 115–122°, wasserfrei bei 144°. Die Differenz erklärt sich wahrscheinlich durch Beimengung eines Nitroprodukts (Kotake).

<sup>1)</sup> Y. Kotake, Ztschr. f. physiol. Ch. **65**. 397. 1910.

<sup>2)</sup> E. Baumann, Ztschr. f. physiol. Ch. **6**. 192. 1882. — E. Blendermann, ebenda **6**. 256. 1882.

<sup>3)</sup> Y. Kotake, Ztschr. f. physiol. Ch. **69**. 409. 1910. — E. Schmitz, Biochem. Ztschr. **28**. 119. 1910.

<sup>4)</sup> O. Neubauer, Deutsch. Arch. f. klin. Med. **95**. 211. 1908. — E. Erlenmeyer u. Lipp, Liebigs Ann. **209**. 226. 1883.

2. Durch Kochen der Säure mit frisch gefälltem Calciumcarbonat erhält man das Kalksalz, das mit  $4\frac{1}{2}$  Mol. Krystallwasser krystallisiert (Kotake).

Durch Bleiessig wird die Säure fast quantitativ gefällt, nicht durch Bleiacetatlösung.

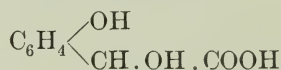
3. Bei Injektion an Kaninchen erscheinen sowohl l- als d-l-Oxyphenylmilchsäure fast vollständig unverändert im Harn (Kotake).

C. Darstellung. Zur Isolierung der Säure aus dem Harn nach Phosphorvergiftung wurde dieser auf dem Wasserbad eingedampft, der Rückstand mit heissem Alkohol extrahiert, nach Verjagen des Alkohols das Extrakt mit Wasser aufgenommen, mit Schwefelsäure stark angesäuert und mit Äther erschöpfend ausgeschüttelt. Nach dem Verdunsten des Äthers blieben Krystalle zurück, die, zweimal aus Wasser umkrystallisiert, rein waren (Kotake).

Schultzen und Riess<sup>1)</sup> isolierten bei mehreren Fällen von akuter Leberatrophie aus dem Harn eine Säure, deren Analyse auf die Formel  $C_8H_8O_4$  stimmte. Die Darstellung erfolgte im wesentlichen ebenso wie die für Oxyphenylmilchsäure beschriebene, nur dass der Ätherrückstand noch mit Bleizucker und dann mit Bleiessig gefällt wurde und aus der Bleiessigfällung durch Zersetzung mit Schwefelwasserstoff die Säure rein dargestellt wurde.

Die Krystalle enthielten  $\frac{1}{2}$  Mol. Krystallwasser und schmolzen bei  $162^\circ$ , das Kalksalz enthielt 2 Mol. Krystallwasser. Beim Erhitzen für sich oder mit Kalkhydrat lieferte die Säure Phenol.

Schultzen und Riess geben auf Grund ihrer Analysen der Säure die Formel einer Oxymandelsäure



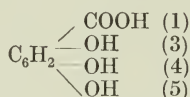
Ellinger und Kotake zeigten aber durch Synthese der racemischen wie der optisch aktiven Oxymandelsäuren, dass die Säure von Schultzen und Riess von diesen verschieden ist. Ob auch hier Oxyphenylmilchsäure vorlag, lässt sich nachträglich nicht entscheiden. Die Verschiedenheit der Säuren wurde von Fromherz bestätigt. Nach einer kurzen Angabe von Neubauer<sup>2)</sup> soll die bei akuter, gelber Leberatrophie beobachtete Säure mit der l-p-Oxyphenylmilchsäure identisch sein.

<sup>1)</sup> O. Schultzen u. L. Riess, Ann. d. Charitékrankenhaus 15. 74. 1869.

<sup>2)</sup> A. Ellinger u. Y. Kotake, Ztschr. f. physiol. Ch. 65. 402. 1910. — K. Fromherz, ebenda 70. 371. 1911. — O. Neubauer, Zentralbl. f. Physiol. 25. 1104. 1911.

Nach derselben Methode erhielten Schultzen und Riess<sup>1)</sup> aus dem Ätherextrakt von Harn bei akuter Phosphorvergiftung warzige Gruppen von zarten, farblosen, rhombischen Plättchen einer neuen aromatischen, stickstoffhaltigen Säure. (Beim Schmelzen mit Kalium lieferte dieselbe Cyan und bei der Destillation mit Kalk trat Anilin auf.) Die Säure schmolz konstant bei 184—185°, bräunte sich dabei und erstarrte erst unter 100° teilweise. Ihre wässrige Lösung reagierte stark sauer und bildete bei der Behandlung mit kohlensaurem Baryt ein in Nadeln krystallisierendes, in Wasser ungemein lösliches Barytsalz. Bleizucker und Bleiessig fällten das Salz nicht, salpetersaures Silber gab aber mit der konzentrierten Lösung einen käsigen Niederschlag, der sich unter geringer Bräunung in kochendem Wasser löste und beim Erkalten in glänzenden weissen, zu Drusen angeordneten Nadeln anschoss; dieses Silbersalz war wasserfrei und enthielt 33,92% Silber.

### III. Gallussäure.



A. Vorkommen. Sie findet sich nach Baumann<sup>1)</sup> zuweilen im Pferdeharn in deutlich nachweisbarer Menge; ihr Auftreten im Harn ist ohne Zweifel durch die mit der Nahrung aufgenommenen Gerbstoffe bedingt.

B. Eigenschaften. 1. Seidenglänzende Nadeln oder trikline Prismen mit 1 Mol.  $\text{H}_2\text{O}$ . Sie schmilzt bei 222—240° unter Zersetzung zu Pyrogallol  $\text{C}_6\text{H}_3(\text{OH})_3$  und Kohlensäure, löst sich in 130 Teilen kaltem und in 3 Teilen siedendem Wasser, leicht in absolutem Alkohol, schwerer in Äther.

2. Die Säure selbst wird durch Bleizucker gefällt.

3. Eine Lösung der Säure bräunt sich mit Alkalien und reduziert Kupferhydroxyd in alkalischer, Silberoxyd in ammoniakalischer Lösung. Sie gibt mit Eisenchlorid (und anderen Eisenoxydsalzen) unter Reduktion desselben zu Eisenoxyduloxyd einen blauschwarzen im Überschuss des Eisenchlorids mit grüner Farbe löslichen Niederschlag. Der Bleiniederschlag wird durch Kalilauge schön karminrot und löst sich im Überschuss der Lauge mit himbeerroter Farbe (Harnack)<sup>2)</sup>.

4. Gegen Millonsches Reagens verhält sich die Gallussäure so, dass man die Reaktion bei oberflächlicher Betrachtung mit einer echten Millonschen verwechseln könnte. Sie gibt mit dem fertigen Reagens und ebenso mit salpetersaurem Quecksilberoxyd allein einen ziegelroten Niederschlag, der aber beim Kochen graubraun wird; setzt man der (schwach gelben) heissen Flüssigkeit, welche nach dem Zusatz von Mercurinitrat allein entstanden ist, salpetrigsaures Kali zu, so wird der Niederschlag grau und schwammig und die Flüssigkeit rotorange, selbst dunkelrot. — Versetzt man den ziegelroten Niederschlag in der Kälte mit Kaliumnitrit, so wird er weiss; kocht man darauf, so erhält man, je nach den gegenseitigen Mengenverhältnissen, einen ockergelben oder braunroten Niederschlag in einer gelben oder dunkel rotgelben Flüssigkeit (Huppert).

C. Darstellung. Die rohen Oxsäuren (s. I. 1. B.) aus Pferdeharn werden mit Bleizucker ausgefällt, der Niederschlag ausgewaschen, mit Salzsäure oder Schwefelsäure zerlegt und die Flüssigkeit mit Äther ausgeschüttelt. Der Rückstand, welchen die ätherische Lösung beim Verdunsten hinterlässt, wird in Wasser gelöst und die Lösung zur Krystallisation verdunstet.

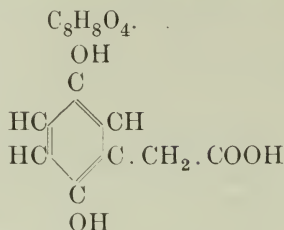
D. Bestimmung der Gallussäure s. bei Homogentisinsäure S. 862.

<sup>1)</sup> Baumann, Ztschr. f. physiol. Ch. 6. 193.

<sup>2)</sup> E. Harnack, Arch. d. Pharm. 234. 517; Chem. Zentralbl. 1896. II. 804.

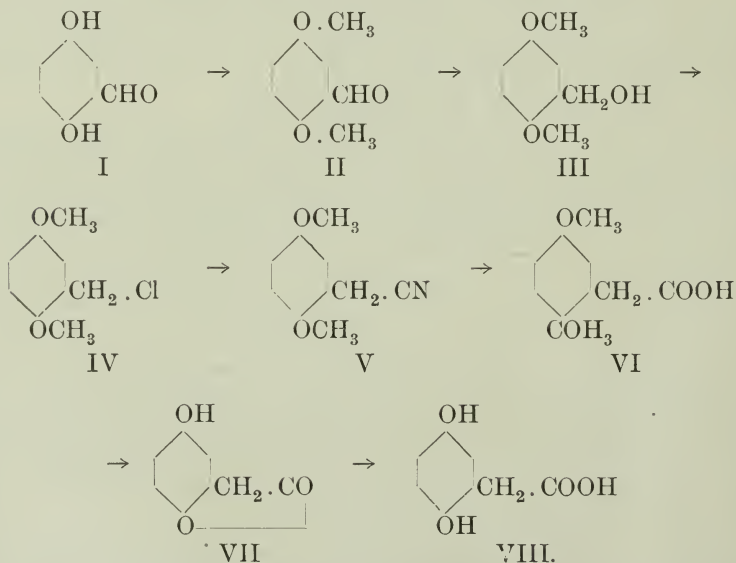


## IV. Homogentisinsäure (Alkaptonurie)\*).



Syn.: 1.4 Dioxyphenyl-3-Essigsäure, Hydrochinonessigsäure.

Die Konstitution der Säure folgt aus der von Baumann und Fränkel<sup>1)</sup> ausgeführten Synthese. Der durch Einwirkung von Chloroform und Kalilauge auf Hydrochinon erhaltliche Gentisinaldehyd (I) wurde in den Dimethylgentisinaldehyd (II) übergeführt, der zum Alkohol (III) reduziert wurde; aus dem Alkohol wurde das Chlorid (IV), aus diesem das Cyanid (V) gewonnen. Das letztere liefert beim Verseifen die Dimethylhomogentisinsäure (VI), aus welcher das Lacton der Homogentisinsäure (VII) und diese selbst (VIII) erhalten wurde:



Harne, die Homogentisinsäure enthalten, sind ausgezeichnet durch besondere Reduktionsfähigkeit, ohne die übrigen Eigenschaften der zuckerhaltigen Harne zu haben, und durch die Eigenschaft nach Zusatz

\*) Von Alkali und καπτεν = begierig verschlucken.

<sup>1)</sup> E. Baumann u. S. Fränkel, Ztschr. f. physiol. Ch. 20. 219. 1894.

von Alkalien unter Sauerstoffabsorption sich dunkelbraun bis schwarz zu färben.

Boedeker, welcher auf die Säure zuerst aufmerksam machte, hat sie nur in unreinem Zustand vor sich gehabt; die Substanz war amorph und enthielt noch Stickstoff; er nannte sie Alkapton. Ebstein und Müller gewannen aus Harn einen dem Alkapton sehr ähnlichen Körper in rechtwinkligen Säulen (aus Wasser), hielten ihn aber für Brenzcatechin. W. Smith gelangte zu der Ansicht, die Säure sei Protocatechusäure, wogegen Kirk u. a. geltend machte, dass die Protocatechusäure die Fehlingsche Flüssigkeit nicht reduziert, während es die fragliche Säure tut; er gab ihr deshalb einen anderen Namen: Urrhodinsäure, doch war diese Säure noch keineswegs rein, sondern noch von phenolartiger Substanz begleitet. Marshall hat die Homogentisinsäure als Glycosursäure beschrieben (Baumann), und Kirk im Verein mit Gibson die „Uroleucinsäure“ in analysierbarem Zustand dargestellt. Danach entdeckten Wolkow u. Baumann<sup>1)</sup> die Homogentisinsäure und unterwarfen sie einer eingehenden Untersuchung. Die ältere Literatur über die Alkaptonsäuren ist von Wolkow u. Baumann zusammengestellt.

Die Homogentisinsäure ist seitdem oft aufgefunden worden, auch in dem Fall von Kirk und Huppert, bei dem diese die Uroleucinsäure oder Hydrochinonmilchsäure gefunden hatten. Der Befund dieser Säure beruht nach Garrod und Hurlley auf einem Irrtum. Originalpräparate von Kirk, dem Huppert sein Material verdankte, ergaben bei der Nachuntersuchung durch Garrod und Hurlley, dass es sich um verunreinigte Homogentisinsäure handelte, und aus neuen Urinproben des Kirkschen Falles liess sich neben der Homogentisinsäure keine zweite Alkaptonsäure gewinnen. Überdies zeigten Neubauer und Flatow<sup>2)</sup>, dass die synthetisch gewonnene Hydrochinonmilchsäure sich in ihren Eigenschaften von der Uroleucinsäure Kirks und Hupperts unterscheidet.

A. Vorkommen. Die Homogentisinsäure ist ebenso häufig im Harn von Kindern als von Erwachsenen beobachtet worden, einige Male bei Geschwistern. In der Regel hält die Alkaptonurie das ganze Leben lang an. Gesundheitsstörungen sind mit ihr nicht verbunden, sie kann aber auch bei Kranken vorhanden sein. Das Vorkommen von vorübergehender Alkaptonurie (Zimnicki, Geyger, Hirsch) bedarf noch der Bestätigung.

Die im Harn enthaltene Menge beträgt nach Bestimmungen

<sup>1)</sup> Boedeker, Ztschr. f. rat. Med. [3] 7. 138. 1859; Ann. d. Ch. u. Pharm. 117. 98. 1861. — W. Ebstein u. J. Müller, Virchows Archiv 62. 554. 1875. — W. Smith, Dublin Journal of med. Sc. 2. 1882. 465; Virchow-Hirschs Jahrb. 1882. 1. 166. — R. Kirk, Brit. med. Journ. November 27. 1886. 1017. — J. Marshall, Amer. Journ. of Pharm. 59. 131. March 1887; Ztschr. f. analyt. Ch. 27. 120. 1888; Chem. Zentralbl. 1887. 724; Med. News, Jan. 8. 1887; Jahresber. f. Tierch. 1887. 225. — Baumann, Ztschr. f. physiol. Ch. 18. 306. 1893. — Rob. Kirk, Brit. med. Journ. Aug. 4. 1888. 232; Journ. of Anat. and Physiol. 23. 69. — M. Wolkow u. E. Baumann, Ztschr. f. physiol. Ch. 15. 228. 1891.

<sup>2)</sup> A. E. Garrod, Med.-chirurg. Transactions 82. 367. 1899 (dort die Kasuistik bis zum Jahre 1899). Die neuere Literatur ist in den Croonian Lectures 1908 von A. E. Garrod, Inborn errors of metabolism. London 1909, Kap. III, S. 40—81 zu finden. — A. E. Garrod u. W. C. Hurlley, Journ. of physiol. 36. 136. 1907. — O. Neubauer u. L. Flatow, Ztschr. f. physiol. Ch. 52. 357. 1907.

von Wolkow und Baumann, Ogden, sowie Stange 0,2 bis 0,4 % oder 3–6 g in der Tagesmenge. Die grössten beobachteten Mengen sind 16,5 in einem Falle von Zimmer, 16–18 g im Falle von Gross und Allard<sup>1)</sup>. Bei ausschliesslicher Fleischkost ist sie (um ein Viertel bis über das Doppelte) grösser als bei gemischter Kost (Wolkow und Baumann, Ogden). Gärungswidrige Substanzen und Abführmittel wie Kefir, Terpentilöl, Rizinusöl, Magnesia usta, Karlsbader Salz (Embdén, Stange) sind ohne Einfluss auf die Menge der ausgeschiedenen Homogentisinsäure.

Von den in den Eiweisskörpern enthaltenen Aminosäuren bewirken Tyrosin und Phenylalanin eine Vermehrung der Homogentisinsäure. Während gesunde Menschen von der eingegebenen Säure nur wenig ausscheiden, erscheinen beim Alkaptonuriker nach Embdén, dessen absolute Werte wohl zu niedrig gefunden wurden (s. E. 1), von 10 g 7,5 g im Harn wieder; nach Grutterinck und Hijmans v. d. Bergh wird die Säure vom Alkaptonuriker quantitativ wieder ausgeschieden, im Gegensatz zu Embdén fanden sie die Toleranz normaler Personen beschränkt; in einigen Fällen von schwerem Diabetes und Lebererkrankungen sahen Falta, Langstein u. a.<sup>2)</sup> die Toleranz ebenfalls vermindert.

Fast die berechnete Menge tritt im Harn nach Zufuhr von 10 g l-Tyrosin auf (Wolkow und Baumann, Embdén, Mittelbach, Schumm). Von 5 g Phenylalanin fanden Falta und Langstein etwa 89% als Homogentisinsäure im Harn. Dipeptide des Tyrosins und Phenylalanins liefern die ihrem Gehalt an diesen Aminosäuren entsprechenden Mengen Homogentisinsäure (Abderhalden, Bloch und Rona)<sup>3)</sup>.

Unter der Annahme, dass die Homogentisinsäure auch beim normalen Menschen ein intermediäres Abbauprodukt der aromatischen Eiweisskomponenten darstellt, das beim Alkaptonuriker der weiteren Oxidation entzogen bleibt, haben namentlich Neubauer und Falta, Neubauer allein und Blum<sup>4)</sup> eine grosse Reihe von aromatischen Substanzen auf ihr Verhalten im Stoffwechsel des Alkaptonurikers ge-

<sup>1)</sup> H. V. Ogden, Ztschr. f. physiol. Ch. **20**. 280. 1894. — P. Stange, Virchows Arch. **146**. 86. 1896. — H. Embdén, Ztschr. f. physiol. Ch. **17**. 182. 1892; **18**. 304. 1893. — O. Zimmer, Über Alkaptonurie. Inaug.-Diss. Würzburg 1903. — O. Gross u. E. Allard, Ztschr. f. klin. Med. **64**. 359. 1907.

<sup>2)</sup> A. Grutterinck u. A. A. Hijmans v. d. Bergh, Ned. Tijdschr. v. Geneesk. 1907. II. 1117 zit. n. Jahresb. f. Tierch. **37**. 863. — W. Falta u. L. Langstein, Ztschr. f. physiol. Ch. **37**. 513. 1903.

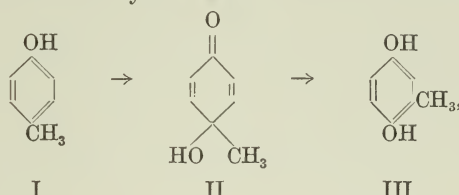
<sup>3)</sup> F. Mittelbach, Deutsch. Arch. f. klin. Med. **71**. 50. 1901. — O. Schumm, Münch. med. Woch. 1904. 1599. — E. Abderhalden, B. Bloch u. P. Rona, Ztschr. f. physiol. Ch. **52**. 435. 1907.

<sup>4)</sup> O. Neubauer u. W. Falta, Zeitschr. f. physiol. Ch. **42**. 81. 1904. — O. Neubauer, Deutsch. Arch. f. klin. Med. **95**. 211. 1909. — L. Blum, Arch. f. exper. Pathol. u. Pharmakol. **59**. 269. 1908.

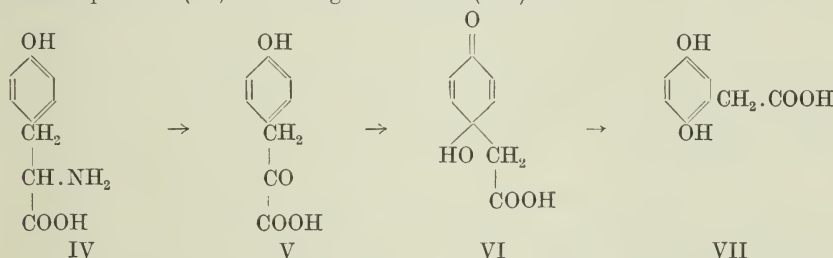
prüft. Von den Resultaten mag hier hervorgehoben werden, dass wie die genannten Aminosäuren sich die Phenylmilchsäure und Phenylbrenztraubensäure, sowie die p-Oxyphenylbrenztraubensäure verhalten, während p-Oxyphenylmilchsäure keine Vermehrung der Homogentisinsäure im Harn bewirkt. Auch Tryptophan wird nicht in Homogentisinsäure umgewandelt.

Die Umwandlung des Tyrosins in Homogentisinsäure wird wohl am besten durch folgendes von Neubauer im Anschluss an Ausführungen von E. Meyer und Friedmann und an experimentelle Untersuchungen über chinolartige Verbindungen (Bamberger, Kumagai und Wolfenstein) vorgeschlagene Schema veranschaulicht:

Wie p-Kresol (I) durch Kaliumpersulfat und Schwefelsäure über p-Toluchinol (II) zu Homohydrochinon oxydiert wird:



so geht Tyrosin (IV), bzw. Oxyphenylbrenztraubensäure (V) durch gleichzeitige Oxydation an der Seitenkette und am Kern über das chinolartige, hypothetische Zwischenprodukt (VI) in Homogentisinsäure (VII) über:



Nach den quantitativen Bestimmungen, die darüber vorliegen, scheint beim Alkaptonuriker die Stoffwechselstörung, die darin besteht, dass die aromatischen Komplexe der Eiweisskörper nicht weiter abgebaut werden, stets eine komplette zu sein. Das Verhältnis der Homogentisinsäure zum Gesamt-Stickstoff (Hs : N) beträgt meist etwa 50:100 und hängt nur von der Eiweisszersetzung und dem Gehalt der zersetzten Eiweisskörper an aromatischen Komplexen (E. Meyer, Langstein u. Meyer, Falt a), nicht von verschiedenen Graden der Stoffwechselanomalie ab (Garrod und Hele)<sup>1)</sup>.

Gross und Allard widersprechen der Annahme, dass die Stoffwechselstörung meist eine komplette sei und weisen auf die Unsicherheit unserer Kenntnisse über den Gehalt der Eiweisskörper an aromatischen Gruppen hin. Sie fanden in ihrem Falle für den Quotienten Hs : N einen Mittelwert von 70 : 100. Der Wert stieg sogar auf 86,3 bei Darreichung von 30 g Natriumbicarbonat und auf 83,4 bei hohem Fieber.

Ob die Homogentisinsäure als normales intermediäres Stoffwechselprodukt anzusehen ist, das der Alkaptonuriker nicht weiter abbauen kann, während sie normalerweise über Acelessigsäure weiter oxydiert wird

<sup>1)</sup> E. Meyer, Deutsch. Arch. f. klin. Med. **70**. 443. 1901. — L. Langstein u. E. Meyer, ebenda **78**. 161. 1903. — W. Falt a, ebenda **81**. 231. 1904. — A. E. Garrod and T. S. Hele, Journ. of physiol. **33**. 197. 1905.



(Embden, Salomon und Schmidt), oder ob bei ihm eine andere Art des Abbaus statthat, ist noch nicht entschieden. Nach Garrod (S. 67—73) spricht mehr zugunsten der ersten Ansicht. Dagegen halten Wakemann und Dakin<sup>1)</sup> es für wahrscheinlicher, dass die Alkaptonurie eine Stoffwechselstörung ist, bei der die Bildung der Homogentisinsäure ebenso abnorm ist wie die Unfähigkeit, die gebildete Säure zu zerstören. Denn sie sahen, dass p-Methylphenylalanin und p-Methoxyphenylalanin, die nach ihrer Konstitution nicht die oben erwähnte Umwandlung in p-Chinonderivate erleiden können, einerseits in der normalen Leber auch in Acetessigsäure übergehen, andererseits vom Alkaptonuriker verbrannt werden.

Ein Zusammenhang mit anderen Erkrankungen hat sich bisher nicht feststellen lassen; als Folgeerscheinung der Alkaptonurie scheint bisweilen Ochronose aufzutreten (Lit. s. bei Garrod, S. 44 ff.).

Abderhalden<sup>2)</sup> konnte einmal aus dem Harn eines Menschen, der 50 g l-Tyrosin verzehrt hatte, einige Dezigramme Homogentisinsäure rein darstellen.

**B. Eigenschaften.** 1. Die Säure bildet farblose Prismen vom Schmelzpunkt 147°, löst sich leicht in Wasser, Alkohol und Äther, in Chloroform, Benzol und Toluol ist sie auch in der Wärme fast unlöslich. Sie krystallisiert mit 1 Mol. Wasser, das sie an der Luft teilweise, vollständig über Schwefelsäure in 24 Stunden verliert. Bei 100° verliert sie ein weiteres Molekül Wasser unter Lactonbildung. Wenig über 100° sublimieren feine, in Wasser unlösliche Nadeln des Lactons vom Schmelzpunkt 191°.

Die Säure wird am besten aus Wasser umkrystallisiert, aber nur mit grossen Verlusten. Die wasserfreie Säure erhält man in durchsichtigen Blättchen, wenn man zu der Lösung in wenig absolutem Alkohol siedendes Chloroform im Überschuss hinzugibt und langsam erkalten lässt (Wolkow und Baumann).

2. Die wässrige Lösung der Säure färbt sich bei längerem Stehen an der Luft dunkel. Mit Ammoniak oder Natronlauge tritt meist sofort Braun- oder Schwarzfärbung ein, ebenso wirken auch schon Alkalicarbonate (s. auch unter 7). Mit Silberlösung entsteht im ersten Augenblick keine Reaktion, nach wenigen Sekunden aber färbt sich die Flüssigkeit dunkel, während metallisches Silber abgeschieden wird. Die Reduktion erfolgt augenblicklich, wenn man ammoniakalische Silberlösung anwendet. Fehlingsche Lösung wird langsam in der Kälte reduziert. Eine 1% ige Lösung gibt bei der Wismutprobe keine, und selbst eine 5% ige Lösung nur eine undeutliche Reduktion.

<sup>1)</sup> G. Embden, H. Salomon u. F. Schmidt, Hofmeisters Beitr. 8. 153. 1906. — A. J. Wakeman and H. D. Dakin, Journ. of biol. chem. 9. 129. 1911 und H. D. Dakin, ebenda 9. 151. 1911.

<sup>2)</sup> E. Abderhalden, Zeitschr. f. physiol. Chem. 77. 454. 1912.

Eisenchloridlösung gibt eine sehr rasch vorübergehende Blaufärbung, die noch bei einer Verdünnung von 1:4000 deutlich ist. Dabei entsteht Benzochinonessigsäure bzw. deren Chinhydron (s. B. 7.). Beim Kochen mit konzentrierter Eisenchloridlösung tritt der Geruch von Chinon auf (Wolkow und Baumann).

Mit Millons Reagens wird die wässrige Lösung (ebenso wie eine Hydrochinonlösung) gelb gefärbt, nach kurzer Zeit entsteht in der Kälte ein gelber amorpher Niederschlag, der sich beim Erhitzen ziegelrot färbt.

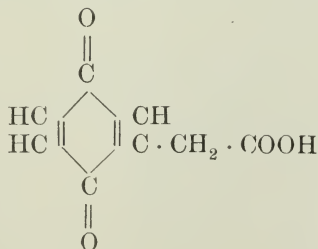
3. Das Bleisalz  $(C_8H_7O_4)_2Pb, 3H_2O$  erhält man in farblosen oder bräunlichen, durchsichtigen, glänzenden Prismen auf Zusatz von Bleizucker oder Bleiessig zu einer nahe bis zum Sieden erhitzten 1%-igen Lösung der Säure; beim Erkalten krystallisiert das Salz aus, vollständiger aus der mit Bleiessig als aus der mit Bleizucker versetzten Lösung. Auch eine mit Soda neutralisierte Lösung der Säure gibt mit Bleiacetat dasselbe Salz. Es löst sich bei  $20^\circ$  in 675 Teilen Wasser, in Bleiacetatlösung etwas leichter als in Wasser und zersetzt sich bei dem Versuch, es umzukrystallisieren. In Alkohol und in Äther ist es unlöslich. Das Krystallwasser entweicht nicht an der Luft, aber über Schwefelsäure oder bei  $100^\circ$ . Schmilzt bei  $214-215^\circ$  unter vollständiger Schwärzung.

4. Der Äthylester  $C_8H_7O_4 \cdot C_2H_5$  bildet farblose Prismen von Schmelzpunkt  $119^\circ-120^\circ$ , ist schwer löslich in kaltem, leichter in heissem Wasser, leicht in Alkohol und in Äther, schwer in Benzol und in Chloroform. Er bildet sich schon beim Destillieren der ätherisch-alkoholischen Lösung, ist also in der rohen Säure enthalten, entgeht aber der Fällung mit Bleiacetat.

5. Tritt Luft zu dem bei der Sublimation gebildeten Dampf, so färbt sich das Sublimat, wie das Hydrochinon, blau.

6. Beim Schmelzen mit Kalihydrat geht die Säure in Gentisinsäure (Hydrochinoncarbonsäure)  $C_6H_3(OH)_2COOH$  und in Hydrochinon über.

7. Durch Oxydation mit Chromsäure geht Homogentisinsäure in Benzochinonessigsäure



über (C. Th. Mörner<sup>1)</sup>): Man löst 1 g Homogentisinsäure in 20 ccm

<sup>1)</sup> C. Th. Mörner, Zeitschr. f. physiol. Chem. 78. 306. 1912.

Wasser, die mit 2 g Schwefelsäure angesäuert sind, kühlt auf 0° ab und fügt tropfenweise unter Umrühren 2 ccm gesättigte Natriumbichromatlösung vom spez. Gew. 1,75 zu. Dabei treten goldglänzende, dünne Krystalltafeln in der dunkelgefärbten Flüssigkeit auf, die nach eintägigem Stehen bei 0° abfiltriert und mit Schneewasser gewaschen werden. Die Krystalle können u. a. aus Benzol bei Wasserbadwärme umkrystallisiert werden. Gegen Erwärmen in wässriger Lösung sind sie sehr empfindlich. Sie schmelzen bei 130°. Der Chinoncharakter zeigt sich u. a. in der Fähigkeit, Guajaktinktur und Jodkaliumstärkekleister blau zu färben. Die wässrige Lösung wird beim Stehen allmählich, schneller in der Wärme braun bis schwarzbraun, wobei teilweise Reduktion zu Homogentisinsäure stattfindet.

Homogentisinsäure gibt mit Benzochinonessigsäure in Acetonlösung in äquimolekularen Mengen zusammengebracht auf Zusatz von Benzol reichliche Ausscheidung dunkler Mikrokrystalle von fast schwarzem Metallglanz mit Stich ins Olivbraune, die bei 142° schmelzen und als das „eigne“ Chinhydron der Homogentisinsäure

$$\left\{ \begin{array}{l} \text{C}_6\text{H}_3(\text{OH})_2 \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{COOH} \\ \text{C}_6\text{H}_3\text{O}_2 \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{COOH} \end{array} \right.$$

aufzufassen sind.

Das gleiche Chinhydron entsteht auch beim Zusammenbringen von Homogentisinsäure mit Benzochinon oder von Benzochinonessigsäure mit Hydrochinon, wobei intermediär Benzochinonessigsäure bzw. Homogentisinsäure entstehen müssen.

8. Alkaptochromreaktion (Mörner)<sup>1)</sup>: Bei vorsichtig abgemessener Zufuhr von Luftsauerstoff zur ammoniakalisch gemachten Lösung der Säure oder des Alkapton-Harns nimmt die Flüssigkeit eine prachtvolle, intensive, rotviolette Färbung an. Um die Färbung zu erhalten, soll der Gehalt an Homogentisinsäure etwa  $\frac{1}{4}$ —2%, an  $\text{NH}_3$  1—4% betragen. In zylindrischen Gefäßen bei 20 ccm Flüssigkeitsmenge soll der Gefäßdurchmesser 0,75—2 cm betragen. Je nach dem Verhältnis der Lutoberfläche zum Volumen der Reaktionsflüssigkeit tritt die Alkaptochromreaktion schneller oder langsamer ein; unter den genannten Bedingungen nach einem Tage, bei relativ geringerem Luftzutritt erst nach mehreren Tagen. Nach Erreichung eines Höhepunktes tritt Abnahme der reinen Färbung ein. Viele Salze, Alkalien, auch manche organische Substanzen hemmen die Reaktion. Mörner hat mittels eines langwierigen Verfahrens aus dem Reaktionsgemenge von 20 Litern Alkaptonharn einige Dezigramme eines krystallisierten  $\alpha$ -Alkaptochrom und eines amorphen  $\beta$ -Alkaptochrom genannten Farb-

<sup>1)</sup> C. Th. Mörner, Zeitschr. f. physiol. Ch. 69. 329. 1910.

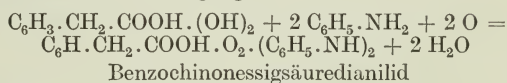
stoffes isoliert. Das erste ist in alkalischer Lösung violett und fluoresziert nicht, das zweite rot mit stark ausgeprägter Fluoreszenz in Gelbrot. Mörner nimmt als wahrscheinlich an, dass es bei der Farbstoffbildung sich um Übergang in ein Chinonimid-Derivat handelt.

Eine ähnliche Farbreaktion liefert auch das Lacton der Homogentisinsäure (Langstein und Meyer).

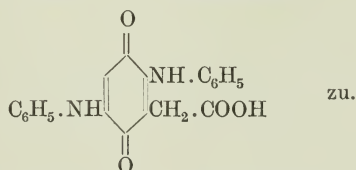
Die starke chromogene Natur der Homogentisinsäure zeigt sich auch darin, dass bei Alkaptonurikern nach Beobachtungen von Poulsen<sup>1)</sup> der Schweiss in den Achselhöhlen, in der Gegend der Pubes etc. öfter blaugrün oder grünschwarz gefunden wird.

9. Versetzt man Alkaptonharn oder Homogentisinsäurelösung mit gesättigter, filtrierter Lösung von Anilin (bzw. Toluidin oder Xylidin) in reichlicher Menge und lässt die Mischung in niedrigen, flachen Gefässen, lose mit Papier bedeckt, einige Wochen stehen, so setzen sich allmählich dunkle amorphe, manchmal auch kristallinische Flocken ab. Sie werden mit 1%iger Kaliumcarbonatlösung, dann sorgfältig mit Wasser gewaschen, getrocknet, aus kochendem Eisessig umkristallisiert, mit Tetrachlorkohlenstoff gewaschen, an der Luft und schliesslich über Schwefelsäure getrocknet. Sie schmelzen bei 228° und lösen sich in konzentrierter Schwefelsäure mit fuchsinroter Farbe, die nach einigen Minuten in kirschrot übergeht und nach 1 Stunde missfarbig, braunviolett wird. Die Zusammensetzung entspricht der Formel  $C_{20}H_{16}N_2O_4$ .

Mörner formuliert den Vorgang:



und weist dem Reaktionsprodukt die Konstitutionsformel



In der gleichen Weise entsteht aus Hydrochinon das Benzochinon-2,5-dianilid vom Schmelzpunkt 89—90° (Hebebrand)<sup>2)</sup>.

Das p-Toluidinderivat der Homogentisinsäure schmilzt bei 231°, löst sich in konzentrierter Schwefelsäure mit blauer Farbe, das m-Xylidinderivat färbt sich ebenso und schmilzt bei 241°.

10. Schüttelt man eine Lösung von Homogentisinsäure in Ammoniak oder Ammoniumcarbonat mit Benzoylchlorid und Natronlauge, so scheidet sich Dibenzoylhomogentisinsäureamid  $(C_6H_5 \cdot CO \cdot O)_2 \cdot C_6H_3 \cdot CH_2 \cdot CO \cdot NH_2$  aus, das beim Eingiessen der heissen alkoholischen Lösung in kaltes Wasser als flockiger Niederschlag, beim Umkristallisieren aus heissem Alkohol in feinen, farblosen Nadeln vom Schmelzpunkt 203—204° erhalten wird. Dieselbe Substanz entsteht auch beim

<sup>1)</sup> Poulsen, Om ochronotiske Tilstande hos Mennesker og Dyr, Kopenhagen 1910. S. 124, zit. n. Mörner.

<sup>2)</sup> A. Hebebrand, Ber. d. chem. Gesellsch. 15. 1973. 1882.



Benzoylieren von Alkaptonharn, ohne dass noch Ammoniak zugesetzt wird. Sie lässt sich mit nitrithaltiger Salpetersäure in Dibenzoylhomogentisinsäure vom Schmelzpunkt 179—180° überführen (Orton und Garrod)<sup>1)</sup>.

C. Darstellung. 1. Der native Harn wird nach Wolkow und Baumann auf das Liter mit 125—150 ccm 12%iger Schwefelsäure versetzt und dreimal mit seinem Volumen Äther ausgeschüttelt, wodurch man die Säuren bis auf einen kleinen Rest (ungefähr 1%) gewinnt. Vorteilhafter ist es, den Harn vor der Behandlung mit Äther zu konzentrieren, doch darf das nur geschehen, nachdem der Harn mit Säure versetzt worden ist, wenn man nicht Verluste erleiden will. Kirk säuert den Harn mit Salzsäure an und dampft ihn auf 0,1 Vol. ein, Embden<sup>2)</sup> versetzt den Harn mit  $\frac{1}{5}$  seines Volumens verdünnter Schwefelsäure und verdampft ihn auf den sechsten Teil.

Von dem ätherischen Auszug wird der Äther abdestilliert, der Rückstand, welcher bei längerem Stehen krystallinisch erstarrt, wird in viel Wasser gelöst, die Flüssigkeit bis nahe zum Sieden erhitzt und reichlich mit einer konzentrierten Bleiessiglösung versetzt. Ein harziger oder amorpher flockiger Niederschlag, welcher dabei entsteht, wird sogleich durch ein Faltenfilter abfiltriert. Beim Erkalten des Filtrats scheidet sich das Bleisalz der Homogentisinsäure in grossen prismatischen Krystallen aus; nach 24 Stunden kann das Salz abfiltriert und mit wenig kaltem Wasser gewaschen werden.

Wolkow und Baumann lösen die aus der Tagesmenge Harn eines Erwachsenen (1,5—2 Liter) gewonnene rohe Säure in 250 ccm Wasser und versetzen die Lösung mit 30 ccm einer 20%igen Bleizuckerlösung. Dabei entgeht aber ein grosser Teil der Homogentisinsäure der Fällung (Huppert), und es ist daher, wie auch Ogden fand, besser, sich des basisch essigsauren Bleies zu bedienen, Umkrystallisieren lässt sich das Salz nicht, da es sich bei dem Versuch, es zu lösen, zersetzt. Reinigen lässt sich das Salz nur, wie schon Kirk angab und wie Embden<sup>3)</sup> empfiehlt, dadurch, dass man die Säure wiederholt mit Bleiacetat fällt. Man zerlegt das fein zerriebene Salz unter Wasser mit Schwefelwasserstoff, kocht aus dem Filtrat den Schwefelwasserstoff weg und fällt wie vorher mit Bleiessig. Entsteht hier zuerst auch ein amorpher Niederschlag, so ist dieser abzufiltrieren, bevor das Salz auszukrystallisieren beginnt.

Marshall hat den Harn mit dem halben Volumen dreibasisch essigsaurem Blei von 1,23—1,24 Dichte gefällt, den Niederschlag mit 45%igem Weingeist gewaschen, mit Schwefelwasserstoff zerlegt, das Filtrat nach dem Wegkochen des Schwefelwasserstoffs siedend mit kohlensaurem Blei gesättigt und die Lösung zur Krystallisation gebracht.

Zur Darstellung der Säure selbst wird das Bleisalz unter Wasser mit Schwefelwasserstoff behandelt, das Filtrat vom Schwefelwasser-

<sup>1)</sup> K. J. P. Orton and A. E. Garrod, Journ. of physiol. **27**. 89. 1901.

<sup>2)</sup> Wolkow u. Baumann a. a. O. 241. — Embden a. a. O. **17**. 190.

<sup>3)</sup> Huppert, Zeitschr. f. physiol. Ch. **23**. 412. — Ogden, daselbst **20**. 282. — Kirk, Brit. med. Journ. a. a. O. — Embden, Ztschr. f. physiol. Ch. **17**. 188.

stoff durch Kochen befreit und auf dem Wasserbad eingedampft, bis es sich dunkler zu färben beginnt. Dann konzentriert man die Flüssigkeit vollends im Vakuum über Schwefelsäure. Die ausgeschiedenen grossen Krystalle können dann noch (nach Wolkow und Baumann am besten aus Wasser, aber unter grossem Verlust) umkrystallisiert werden.

2. Nach Garrod<sup>1)</sup> wird der Urin fast bis zum Sieden erhitzt und auf je 100 ccm 5 g festes neutrales Bleiacetat zugefügt. Von dem dichten Niederschlag, der sich bildet, wird sofort heiss abfiltriert und das klare gelbe Filtrat an einem kühlen Platz stehen gelassen. Nach einiger Zeit beginnt die Abscheidung von homogentisinsaurem Blei. Nach 24 Stunden werden die Krystalle abfiltriert, gewaschen und getrocknet. Zur Gewinnung der freien Säure suspendiert man das Bleisalz in Äther und leitet Schwefelwasserstoff durch. Man filtriert vom Schwefelblei, lässt den Äther verdunsten und erhält so farblose Krystalle vom Schmelzpunkt 146—147°.

C. Th. Mörner<sup>2)</sup> zersetzt das nach Garrod dargestellte Bleisalz bei Zimmerwärme unter fleissigem Umschütteln mit der berechneten Menge doppeltnormaler Schwefelsäure (175 ccm pro 100 g Bleisalz). Vom Bleisulfat wird abfiltriert, das Filtrat im Vakuum bei Zimmertemperatur bis zur reichlichen Krystallisation konzentriert, die Krystalle kräftig ausgepresst, in wenig Wasser gelöst und filtriert. Die Lösung wird nochmals im Vakuum konzentriert, bis nur wenig Mutterlauge zurückbleibt, die Krystalle abermals ausgepresst und bei Zimmertemperatur über Schwefelsäure getrocknet. Die Säure wird so fast farblos und frei von Laktonbeimischung erhalten.

3. Darstellung in Form des Esters: E. Meyer<sup>3)</sup> engt den mit Schwefelsäure angesäuerten Harn ein, schüttelt mit Äther, dem etwas Alkohol zugesetzt wird, drei- bis viermal aus, destilliert den Äther ab und versetzt den Rückstand mit Alkohol. Die alkoholische Lösung wird einige Stunden auf dem Wasserbade am Rückflusskühler gekocht, wobei Veresterung stattfindet. Der überschüssige Alkohol wird abdestilliert und der Rückstand erkalten gelassen. Er erstarrt zu einem dicken Sirup, der zunächst nicht krystallinisch erscheint. Beim Verühren mit kaltem Wasser löst sich die schmierige Masse, während sich feine Kryställchen des schwer löslichen Esters ausscheiden. Die Krystalle werden abfiltriert, auf Ton abgepresst und, wenn nötig, unter Anwendung von Tierkohle umkrystallisiert.

<sup>1)</sup> A. E. Garrod, Journ. of physiol. 23. 512. 1899.

<sup>2)</sup> C. Th. Mörner, Zeitschr. f. physiol. Chem. 78. 307. 1912.

<sup>3)</sup> E. Meyer, Deutsch. Arch. f. klin. Med. 70. 442. 1901. — L. Langstein u. E. Meyer, ebenda 78. 174. 1903.

Zur vollständigen Veresterung kann auch der sirupöse Ätherrückstand mit 96%igem Alkohol aufgenommen und in die Lösung Salzsäuregas bis zur Sättigung eingeleitet werden. Man verdünnt dann mit viel Wasser, neutralisiert mit fester Soda und extrahiert rasch (um die Einwirkung des Alkalis zu verhindern) mehrmals mit Äther. Nach Abdestillieren des Äthers erstarrt der Rückstand krystallinisch. Der Krystallbrei wird sofort mit kaltem Wasser verrieben, wobei sich die braunen Schmierlösen. Die weitere Verarbeitung erfolgt wie oben.

Als bei dem Versuch der Veresterung statt des Einleitens von Salzsäure der alkoholischen Lösung etwas konzentrierte flüssige Salzsäure zugegeben wurde, wurde Homogentisinsäurelaktone erhalten, das die S. 857 erwähnte Farbenreaktion gab.

Bequemer erhält man den Ester nach Schumm<sup>1)</sup> auf folgende Weise: 200 ccm Urin werden mit 30 ccm 25%iger Salzsäure auf dem Wasserbade auf 25—30 ccm eingedampft, der Rückstand mit 90—100 ccm Alkohol in einen Erlenmeyer-Kolben übergeführt, mit 10 ccm rauchender Salzsäure versetzt und der Kolben, mit einem kugelförmigen Glas- oder Porzellanschälchen bedeckt, auf einem lebhaft kochenden Wasserbad eine Stunde erhitzt. Der Kolbeninhalt wird mit etwa 300 ccm Wasser verdünnt, mit Soda schwach alkalisiert und sogleich dreimal mit Portionen von je etwa 80 ccm Äther ausgeschüttelt. Der grösste Teil des Äthers wird abdestilliert, der Rückstand auf dem Wasserbad erhitzt, bis der Rest des Äthers und der Alkohol verjagt sind. Nach einiger Zeit verwandelt sich der sirupöse Rückstand in einen Krystallbrei, rascher, wenn man das Gefäss in Eiswasser kühlt. Die auf Ton abgepresste Krystallmasse wird unter Zusatz von etwas Tierkohle ein- bis zweimal aus wenig Wasser umkrystallisiert.

D. Nachweis. Homogentisinsäure enthaltender Harn ist frisch entleert entweder sehr blass oder eigentümlich braun, färbt sich an der Luft, namentlich bei alkalischer Reaktion, unter starker Sauerstoffabsorption tiefer braun und hinterlässt in der Wäsche dunkelrote oder braune Flecke. Er reduziert Fehling'sche Flüssigkeit und ammoniakalische Silberlösung, aber nicht Wismutoxyd oder Pikrinsäure bei Gegenwart von freiem Alkalihydrat. Durch den negativen Ausfall der letzten zwei Proben, sein starkes Dunkeln an der Luft, ferner durch seine Gärungsunfähigkeit und die optische Inaktivität unterscheidet er sich von einem zuckerhaltigen Harn.

Diese Reaktionen sind jedoch denen solcher Harne sehr ähnlich, welche Brenzkatechin, Hydrochinon oder Gallussäure enthalten. Entscheidend ist nur die Reindarstellung der Substanz. Die Homogen-

<sup>1)</sup> O. Schumm, Münch. med. Wochenschr. 1904. 1603.



tisinsäure lässt sich am einfachsten durch Bestimmung des Wassergehaltes ihres Bleisalzes erkennen; es gibt bei 100° 9,08% ab. Die Bestimmung des Schmelzpunktes ihres Bleisalzes (214—215°) ist, so einfach sie erscheint, doch darum schwierig, weil sich das Salz vor dem Schmelzen vollständig schwärzt und die Verflüssigung desselben dann schwer zu erkennen ist. Die Ermittlung des Bleigehalts (durch wiederholtes Abrauchen mit Schwefelsäure bis zur Gewichtskonstanz) ist langwierig und für Ungeübte nicht leicht. Neben der Bestimmung des Wassergehaltes des Bleisalzes kann man noch den Schmelzpunkt der freien Säure (145—147°) oder des Esters ermitteln. Auch die Gewinnung von Dibenzoylhomogentisinsäureamid (s. B. 10) kann zum Nachweis benutzt werden. Man hüte sich dabei aber vor Verwechslungen mit dem Tribenzamid (s. S. 692).

E. Bestimmung. Das von Baumann<sup>1)</sup> angegebene Verfahren beruht darauf, dass die Homogentisinsäure Silberoxyd in ammoniakalischer Lösung reduziert. Es wird das Reduktionsvermögen des Harns für 0,1 normale Silbernitratlösung ermittelt; 1 ccm derselben zeigt 4,124 mg Homogentisinsäure an.

10 ccm Harn werden in einem Kölbchen mit 10 ccm 3%igem Ammoniak und, um der Oxydation der Homogentisinsäure durch den Sauerstoff der Luft vorzubeugen, sofort mit einigen ccm 0,1 normaler Silbernitratlösung versetzt, umgeschüttelt und 5 Minuten stehen gelassen. Damit das suspendierte Silber nicht mit in das Filtrat übergeht, wird in der Flüssigkeit durch Zusatz von 5 Tropfen 10%iger Chlorcalciumlösung und 10 Tropfen Ammoncarbonat ein Niederschlag von Calciumcarbonat erzeugt. Gibt das Filtrat mit der Silberlösung noch einen starken Niederschlag, so setzt man zu einer neuen Probe Harn 2—3 mal so viel Silberlösung als zur ersten Probe. Hat man auf diese Weise die erforderliche Silbermenge annähernd ermittelt, so prüft man das Filtrat durch Ansäuern mit verdünnter Salzsäure auf überschüssiges Silber; richtig ist die Bestimmung dann, wenn dabei eine eben nur sichtbare Chlorsilbertrübung eintritt. Bei 4—6 maliger Wiederholung des Versuchs kann dieser Punkt scharf getroffen werden. Das Erkennen des Chlorsilbers wird nach Embden<sup>2)</sup> dadurch erleichtert, dass das tiefbraune alkalische Filtrat auf Zusatz von Salzsäure eine lichtrote Färbung annimmt, sobald man der Endreaktion nahe gekommen (keine oder nur wenig unoxidierte Säure noch vorhanden ist). Sind mehr als 8 ccm Silberlösung erforderlich, so müssen auf 10 ccm Harn 20 ccm des 3%igen Ammoniaks zugesetzt werden.

Das Ammoniak darf nach Baumann nicht stärker als 3%ig sein, weil wegen der Löslichkeit des Chlorsilbers in Chlorammon die Endreaktion unsicher wird; seine Konzentration darf aber auch nicht unter 2,5% sinken. Garrod und Hurlley dagegen verwenden 8%iges Ammoniak, weil sonst die Reduktion in 5 Minuten nicht vollständig ist, so dass die gefundenen Werte um ca. 11% zu niedrig ausfallen. Ein Überschuss von Salzsäure ist zu vermeiden. Am besten lässt man aus einer Bürette ein gleiches Volum einer Salzsäure zufließen, die der verwendeten Ammoniaklösung äquivalent ist. Nach dem Ansäuern soll stets mit Wasser verdünnt werden, damit eine Chlorsilber-Trübung, die durch etwaigen Überschuss von Salzsäure in Lösung blieb, zum Vorschein kommt. — Für normalen Harn

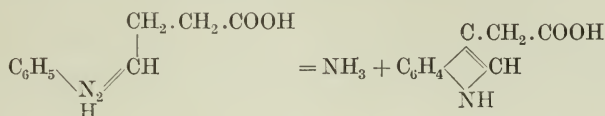
<sup>1)</sup> E. Baumann, Ztschr. f. physiol. Ch. 16. 268. 1891.

<sup>2)</sup> H. Embden, Ztschr. f. physiol. Ch. 18. 309. 1893.

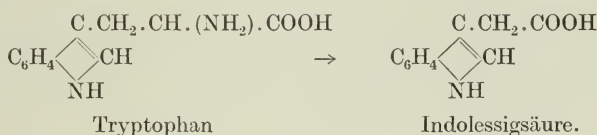




Die Säure ist von E. und H. Salkowski bei ihren Studien über Eiweissfäulnis entdeckt und unter dem Namen Skatolcarbonsäure beschrieben worden, weil sie leicht unter Kohlensäure-Abgabe Skatol liefert. Die Konstitution ist durch Ellinger auf dem Wege der Synthese festgestellt worden: Sie entsteht beim Schmelzen des Phenylhydrazons der  $\beta$ -Aldehydopropionsäure mit Chlorzink.



Nach den Beobachtungen von Hopkins und Cole <sup>1)</sup> entsteht Indolessigsäure bei der Zersetzung von Tryptophan durch Reinkulturen von *Bacterium coli* bei Luftzutritt.



A. Vorkommen. Bei der Darstellung der aromatischen Oxy Säuren des Harns (s. S. 843) wurden von Baumann neben diesen in Wasser schwer lösliche stickstoffhaltige Säuren erhalten, welche sich in öligen Tropfen abschieden, und mit rauchender Salpetersäure, ähnlich dem Indol, einen schön roten Niederschlag gaben, der mit überschüssiger Salpetersäure verharzte. Die verdünnte wässrige Lösung derselben lieferte bei der Fäulnis mit Kloakenschlamm nicht unerhebliche Mengen Skatol, aber kein Indol. Bei anhaltendem Kochen derselben oder des Harns direkt mit starker Salzsäure wurden harzige Produkte erhalten, welche kein Skatol mehr gaben. — E. Salkowski gewann aus menschlichem Harn eine Säure in Lösung, welche nach den Reaktionen Indolessigsäure sein konnte. — In Substanz aus dem normalen Harn dargestellt ist sie mit Bestimmtheit noch nicht; sie dürfte sich nur in sehr kleiner Menge im Menschenharn, etwas reichlicher im Pferdeharn (Jaffe)<sup>2)</sup> vorfinden. Sie entsteht bei der Fäulnis der Eiweisssubstanzen im Darm und geht mindestens zum Teil unverändert in den Harn über.

Die Reindarstellung geringer Mengen der Säure aus einem menschlichen Harn ist zuerst Herter<sup>3)</sup> bei einem 7 jährigen Kinde mit Verdauungsstörungen gelungen, das eine abnorme Darmbakterienflora zeigte. Während die Erreger der Buttersäure-Gärung fast vollkommen fehlten, überwog der *Bac. bifidus communis* (Tissier), der auch in Traubenzucker-Bouillonkultur Indolessigsäure bildet. Im Darminhalt des Pat. konnte Herter ebenfalls Indolessigsäure nachweisen.

Nach Herter ist die Indolessigsäure die Substanz, welche bei gleichzeitiger Anwesenheit von Nitriten auf Zusatz von konzentrierter

<sup>1)</sup> E. u. H. Salkowski, Ber. d. chem. Gesellsch. **13**. 191 u. 2217. 1881; Ztschr. f. physiol. Ch. **9**. 13. 1885. — A. Ellinger, Ber. d. chem. Gesellsch. **37**. 1801. 1904. — F. G. Hopkins und S. W. Cole, Journ. of physiol. **29**. 451. 1903.

<sup>2)</sup> M. Jaffe, Festschrift für O. Schmiedeberg S. 302.

<sup>3)</sup> C. A. Herter, Journ. of biol. chem. **4**. 238 u. 253. 1908.

Salzsäure die Urorosein-Reaktion von Nencki und Sieber (s. Urorosein) gibt.

B. Eigenschaften. 1. Die aus gefaultem Eiweiss dargestellte Säure krystallisiert aus heissem Wasser in kleinen weissen Körnchen und Warzen, aus Benzol in kleinen seidenglänzenden Plättchen. Sie schmilzt bei 164<sup>0</sup> (nach Hopkins und Cole bei 165<sup>0</sup>) und zersetzt sich wenig über ihrem Schmelzpunkt in Kohlensäure und ein schnell krystallinisch erstarrendes Sublimat von Skatol. In kaltem Wasser löst sie sich schwer, leichter in heissem; in Äther, in Alkohol und in heissem Benzol löst sie sich gleichfalls. Mit Wasserdämpfen ist sie nicht flüchtig. Sie ist geruchlos.

2. In unreiner wässriger Lösung zersetzt sie sich beim Eindampfen unter Entwicklung des Geruchs nach Skatol und Bildung eines roten oder violetten Stoffs. Lässt man die wässrige Lösung längere Zeit stehen, so zersetzt sich die Säure teilweise unter Ausscheidung eines pulverigen bräunlichen Niederschlags. Gegen Fäulnisfermente ist sie widerstandsfähig.

3. Ihre Alkalisalze sind leicht löslich und reagieren neutral; in wässriger Lösung hält sich das Natronsalz anscheinend unverändert. In einer Alkalisalzlösung von 0,1% gibt Bleizucker langsam einen krystallinischen Niederschlag; Kupferacetat, Quecksilberchlorid, Eisenchlorid, Silbernitrat nichts oder nur eine leichte Trübung; die mit Quecksilberchlorid versetzte Lösung gibt bei vorsichtigem Hinzufügen von wenig Natronlauge einen grauweisen Niederschlag. Mit Denigès' Reagens (100 g Mercurisulfat in 1 Liter 5%iger Schwefelsäure) gibt die Säure noch in sehr verdünnten Lösungen einen gelben, körnigen Niederschlag (Hopkins und Cole). Aus konzentrierterer Lösung fällt salpetersaures Silber ein schwer lösliches Silbersalz.

4. Erwärmt man die verdünnte Lösung nach Zusatz von wenig Eisenchlorid, so erscheint sie im durchfallenden Licht blaurot und trüb, im auffallenden weisslich grau; säuert man darauf vorsichtig an, so entsteht ein grauvioletter Niederschlag, der sich nach dem Auswaschen in Alkohol leicht mit blauroter Farbe löst. — Säuert man eine 1%ige Lösung der Säure oder eines ihrer Salze mit Salzsäure an, fügt sehr verdünnte Eisenchloridlösung hinzu und erhitzt zum Sieden, so färbt sich die Flüssigkeit kirschrot. Verdünntere Lösungen (bis 1:100 000) werden nach E. Salkowski<sup>1)</sup> nur violett. Der Farbstoff löst sich leicht in Amylalkohol, dagegen nicht in Äther, in Benzol und in Chloroform. Essigäther nimmt aus einer konzentrierten Lösung roten Farbstoff auf, beim Schütteln mit einer verdünnten Lösung färbt sich der Essigäther nur gelb, und die rückständige wässrige Lösung

<sup>1)</sup> E. Salkowski, Ztschr. f. physiol. Ch. 9. 23. 1885.

besitzt danach eine noch schönere Färbung; allen Farbstoff nimmt der Essigäther niemals auf.

5. Versetzt man nach E. Salkowski eine 1%ige Lösung der Säure mit einigen Tropfen Salpetersäure von 1,2 Dichte und wenig Tropfen einer 2%igen Kaliumnitritlösung, so färbt sie sich schnell kirschrot und scheidet einen roten Farbstoff ab, welcher sich mit Essigäther oder Amylalkohol leicht ausschütteln lässt, der dagegen in Äther, in Benzol und in Chloroform unlöslich ist. Die Lösung des Farbstoffs in Essigäther zeigt einen Absorptionsstreifen in Grün. Natronlauge entzieht dem Essigäther den Farbstoff und färbt sich dabei gelb; beim Ansäuern geht der Farbstoff wieder mit roter Farbe in den Essigäther über. Die Reaktion tritt noch ein bei einer Verdünnung von 1:10 000. Ein Überschuss von salpetriger Säure zerstört den Farbstoff. Der Farbstoff unterscheidet sich vom Nitrosoindol dadurch, dass dieses nach der Reduktion mit verdünnter Natronlauge und Zinkstaub an der Luft blau, der fragliche Farbstoff aber dauernd entfärbt wird.

6. Versetzt man eine 1%ige Lösung der Säure oder eines ihrer Salze mit dem gleichen Volumen Salzsäure von 1,2 Dichte und mit einigen Tropfen schwacher Chlorkalklösung (Jaffesche Indicanprobe), so färbt sie sich allmählich purpurrot und setzt bei längerem Stehen einen purpurroten, in Alkohol leicht löslichen Niederschlag ab. Auch bei zehnfacher Verdünnung dieser Lösung tritt die Reaktion noch ein. Gegen Amylalkohol, Äther, Benzol und Chloroform verhält sich dieser Farbstoff wie der durch salpetrige Säure erzeugte, aber Essigäther nimmt ihn nur schwierig oder fast gar nicht auf (E. Salkowski).

7. Indolessigsäure gibt wie die meisten Indolderivate die Hopkinsche Glyoxylsäure-Reaktion. Versetzt man eine wässrige oder alkoholische nicht zu verdünnte Lösung der Säure mit Glyoxylsäurelösung, die durch Reduktion von Oxalsäurelösung mit Natriumamalgam leicht zu erhalten ist, und unterschichtet mit konzentrierter Schwefelsäure, so entsteht an der Grenzschicht eine violette Färbung, die indessen bald verblasst. Auch in nicht ganz reinem Eisessig, der oft etwas Glyoxylsäure enthält, gelöst, gibt die Säure mit konzentrierter Schwefelsäure Violettfärbung mit grüner Fluoreszenz (Adamkiewiczsche Reaktion, E. Salkowski <sup>1)</sup>).

8. Mit einer ca. 2%igen alkoholischen Lösung von p-Dimethylaminobenzaldehyd (Ehrlichs Aldehyd-Reagens) und einigen Tropfen Salzsäure erwärmt, gibt die Säure eine rotviolette Färbung (Herter).

---

<sup>1)</sup> F. G. Hopkins u. S. W. Cole, Proc. Roy. Soc. 68. 21. 1901. — E. Salkowski, Ztschr. f. physiol. Ch. 12. 215 ff. 1888.



Die Reaktionen 4—8 treten auch bei Gegenwart der aromatischen Oxy-säuren auf.

9. Die Säure gibt nach E. Salkowski die Millonsche Reaktion je nach der Art, wie diese angestellt wird, entweder nicht, oder die Flüssigkeit färbt sich schmutzig rotbraun; die aromatischen Oxy-säuren geben die Reaktion.

10. Beim Erwärmen der Säure mit konzentrierter Salpetersäure färbt sich die Flüssigkeit stark gelb (E. Salkowski).

C. Nachweis. Der Harn gibt selbst bei einem sehr geringen Gehalt an Indolelessigsäure (der 48 stündige Harn eines Kaninchens nach Verabreichung von 10 mg der Säure) nach E. Salkowski noch direkt die Reaktion mit Eisenchlorid, mit salpetriger Säure und mit unterchloriger Säure (B. 4—6). Da sich aber auch der nach Einverleibung von Skatol entleerte Harn wenigstens gegen salpetrige und gegen unterchlorige Säure ganz ähnlich verhält und bei normalem Harn die Proben bei der direkten Untersuchung versagen, so ist die Säure erst einigermaßen rein darzustellen.

Man verfährt dazu nach E. Salkowski in folgender Weise. Es werden mehrere Liter Harn eingedampft, der Rückstand mit absolutem Alkohol ausgezogen, die Lösung verdunstet und der Rückstand nach starkem Ansäuern mit Schwefelsäure und Äther ausgeschüttelt. Der ätherischen Lösung wird die Säure durch Schütteln mit Natriumcarbonatlösung entzogen, die alkalische Lösung eingedampft, der Rückstand wiederholt in Alkohol gelöst und verdunstet, die Lösung zuletzt mit Äther gefällt. Man verdunstet alsdann, zieht den Rückstand nach Zusatz von Salzsäure mit Äther aus, verdunstet den Äther, löst den Rückstand in heissem Wasser, verdunstet das Filtrat und bringt den Rückstand nochmals in wässrige Lösung. Mit dieser sind dann die Reaktionen B. 4—6 anzustellen. Bei Harnen, welche reich an Indolelessigsäure sind, krystallisiert aus der letzten wässrigen Lösung die Säure aus; sie kann durch Umkrystallisieren aus Benzol noch weiter gereinigt werden.

Die Indolelessigsäure kann auch in den nach S. 843 dargestellten aromatischen Oxy-säuren mittelst der Reaktionen B. 4—6 aufgesucht werden. Auch kann man sie in dem Gemenge nach E. Salkowski so nachweisen, dass man dasselbe in einem Röhrchen über den Schmelzpunkt der Indolelessigsäure erhitzt, das Röhrchen zerschneidet, mit etwas verdünnter Natronlauge destilliert und im Destillat das Skatol aufsucht.

Herter scheint in dem oben erwähnten Falle, soweit aus seinen kurzen Angaben zu ersehen ist, aus dem Ätherextrakt des Urins die Säure sofort krystallinisch erhalten zu haben. Nach Umkrystallisieren der Krystalle aus Benzol hatten sie den Schmelzpunkt 160—162°, gaben die charakteristische Farbreaktion und spalteten beim Erhitzen Skatol ab.

## II. Unbekannte Substanzen, die bei der Destillation des Harns Indol abspalten.

Jaffe machte zuerst darauf aufmerksam, dass beim Destillieren des normalen Harns von Menschen, Hunden, Kaninchen, Pferden und Hühnern Indol in das Destillat übergeht. Die Ausbeute ist am grössten beim Pferdeharn; aus 7 Liter wurde durch tagelang fortgesetzte Destillation unter Ersatz des verdampfenden Wassers 0,16 g Indol rein gewonnen, obwohl die Destillation nicht bis zur Erschöpfung durch-

geführt war und die Reinigung Verluste bedingte. Porcher<sup>1)</sup> bestätigte die Angabe von Jaffe.

Wahrscheinlich stammt das Indol des Harndestillats aus mehreren Quellen: Durch Ausschütteln des frischen, mit Salz- oder Phosphorsäure angesäuerten Harns mit Äther und Verdampfen des Äthers erhielt Jaffe einen Rückstand, der keine Indolreaktionen gab, dessen wässrige Lösung aber (vorher durch Behandlung mit Soda und Äther in der üblichen Weise von Phenolen befreit) bei der Destillation Indol abspaltete. Jaffe vermutete, dass die ätherlösliche Säure  $\beta$ -Indolcarbonsäure sei, die Identifikation gelang aber nicht. Porcher gibt an, Indolcarbonsäure gefunden zu haben, aber ohne Einzelheiten der Isolierung zu beschreiben.

Nach Jaffe geht die Hauptmenge der indolliefernden Substanzen des Pferdeharns bei Anwendung der Bleifällungsmethode in den Bleiessigniederschlag; mit Bleiacetat fällt nichts davon, mit Bleiessig und Ammoniak nur wenig.

Zur Isolierung aus dem Bleiessigniederschlag verfuhr Jaffe folgendermassen: Der in Wasser suspendierte Niederschlag wurde mit Schwefelwasserstoff zersetzt und das Filtrat vom Schwefelblei mit Äther gründlich ausgeschüttelt, der nur wenig indolgebende Substanz aufnahm. Die saure, mit Äther erschöpfte Flüssigkeit wurde mit Alkali nahezu neutralisiert, auf einen Gehalt von 5% Schwefelsäure gebracht und mit einer 10%igen Lösung von Mercurisulfat in 5%iger Schwefelsäure gefällt. Der Quecksilberniederschlag wurde in der Kälte mit Schwefelwasserstoff zerlegt, das Filtrat vom Schwefelquecksilber 12 mal mit Äther ausgeschüttelt. Der mit Wasser aufgenommene Ätherrückstand wurde mit Kupferacetat gefällt, und nach dem Abfiltrieren des Niederschlages mit Ammoniak unter Vermeidung eines Überschusses gefällt. Nach abermaliger Filtration und Entfernung des Kupfers mit Schwefelwasserstoff wurde eine farblose Lösung erhalten, die noch Spuren Indol-essigsäure und wahrscheinlich das Chromogen des Skatolrots (s. dieses) enthielt. Aus der Lösung wurde durch Zusatz von Salzsäure und Eisenchlorid ein roter Farbstoff erhalten, der mit Amylalkohol ausgeschüttelt und der amyalkoholischen Lösung mit verdünnter Sodalösung entzogen wurde. Die braungelbe, alkalische, filtrierte Lösung lieferte bei der Destillation Indol.

Die Hauptmenge der indolliefernden Substanzen befand sich in dem in Äther unlöslichen Teil des zersetzten Quecksilberniederschlages.

<sup>1)</sup> M. Jaffe, Festschrift f. O. Schmiedeberg S. 299. Leipzig 1908. Suppl. d. Arch. f. exper. Pathol. u. Pharmacol. — Ch. Porcher, Compt. rend. Acad. d. scienc. 148. 1210. 1909.

Die mit Äther ausgeschüttelte saure Lösung wurde mit Baryt von Schwefelsäure befreit, wie der Ätherextrakt sukzessive mit Kupferacetat und Ammoniak gefällt und vom Kupfer befreit. Die fast farblose Flüssigkeit war frei von Indolessigsäure und dem Chromogen des Skatolrots. Eine in dieser Lösung enthaltene unbekannte Substanz und das Chromogen des Skatolrots dürften also — vielleicht neben Indolcarbonsäure — die Quellen des bei der Harndestillation auftretenden Indols sein, während Indolessigsäure, sowie die Indoxylverbindungen nach Jaffes Versuchen bei der Destillation kein Indol liefern.

### III. Kynurensäure.

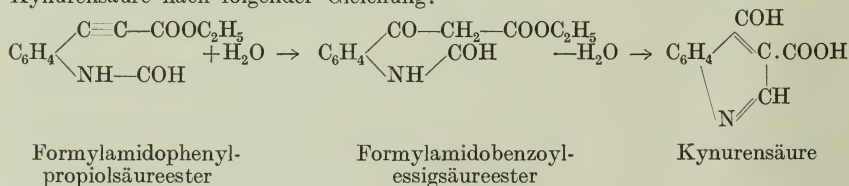


$\gamma$ -Oxy-Chinolin- $\beta$ -carbonsäure.

Die Konstitution der Kynurensäure, die von Liebig im Hundeharn im Jahre 1853 entdeckt wurde, ergibt sich aus folgenden Daten: Schmiedeberg und Schultzen beobachteten die Zersetzung in Kynurin und Kohlensäure (B. 4). Kretschy erkannte im Kynurin ein Oxychinolin (B. 6) und stellte durch Oxy-

dation der Kynurensäure zur Kynursäure  $\text{C}_6\text{H}_4$   $\begin{matrix} \text{COOH} \\ \diagup \\ \text{NH} \end{matrix}$   $\text{CO.COOH}$  fest, dass so-

wohl die Hydroxylgruppe wie die Carboxylgruppe sich im Pyridinkern des Chinolins befinden (B. 8). Wenzel identifizierte das Kynurin mit dem synthetisch dargestellten  $\gamma$ -Oxychinolin und Camps<sup>1)</sup> bestimmte schliesslich die Stellung der Carboxylgruppe durch die Synthese der Kynurensäure. Durch Erhitzen der alkoholischen Lösung von o-Formylamido-phenylpropiolester mit Natronlauge entsteht Kynurensäure nach folgender Gleichung:



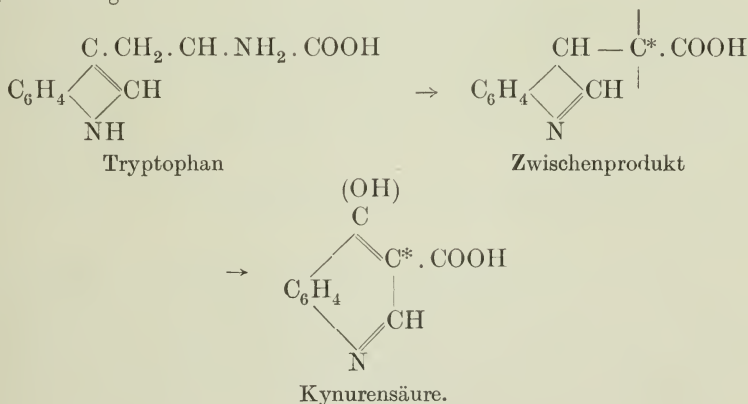
A. Vorkommen. Die Kynurensäure ist bisher normalerweise nur im Harn des Hundes (Liebig) und des kalifornischen Steppenwolves [*Canis ochropus*, Eschholz] (Swain)<sup>2)</sup> gefunden. Bei der Katze und selbst bei den nächsten Verwandten des Hundes, dem Fuchs und Wolf, fehlt sie. Ein Hund scheidet im Tag einige Milligramme bis mehrere Gramm, je nach der Nahrung, aus. Mitunter findet man Hunde, bei denen die Kynurensäure ganz fehlt.

<sup>1)</sup> J. Liebig, Ann. d. Ch. 86. 125, 1853. — R. Camps, Ztschr. f. physiol. Ch. 31. 390. 1901.

<sup>2)</sup> R. E. Swain, Amer. journ. of physiol. 9. 391. 1903.

Die Muttersubstanz der Kynurensäure ist nach Ellinger die Tryptophankomponente der Eiweisskörper. Gibt man einem Hunde, der bei Brot- und Milchfütterung nur wenig Kynurensäure ausscheidet, Tryptophan per os oder subkutan, so scheidet er 20—26% der Menge Kynurensäure aus, die theoretisch aus dem zugeführten Tryptophan entstehen kann. Hunde mit Eckscher Fistel reagieren ebenfalls mit vermehrter Kynurensäure-Ausscheidung (Abderhalden, London und Pincussohn). Auch das Kaninchen wandelt Tryptophan in Kynurensäure um (Ellinger, Baumgarten). Beim Menschen ist es bisher nicht gelungen, künstlich eine Kynurensäure-Ausscheidung hervorzurufen, vielleicht weil die Tryptophandosis (3 g) zu gering war. Nach Hauser kann ein Mensch 4 g Kynurensäure verzehren, ohne dass im Harn etwas davon unverändert ausgeschieden wird. Beim Hunde ist das Vermögen, aufgenommene Kynurensäure zu zerstören, geringer (Hauser, Solomin)<sup>1)</sup>.

Den Übergang des Tryptophans in Kynurensäure, der noch nicht in allen Einzelheiten aufgeklärt ist, wird man sich nach Ellinger<sup>2)</sup> so vorstellen müssen, dass die dreigliederige Seitenkette des Indolrings zu einer zweigliederigen oxydiert wird und das mit dem Carboxyl verbundene Sauerstoffatom der Seitenkette bei der Schliessung des Chinolinringes beteiligt ist:



Die Resultate der zahlreichen Versuche über den Einfluss verschiedener Ernährung auf die Kynurensäure-Ausscheidung, die vor der Aufklärung der Entstehung aus dem Tryptophan angestellt worden sind

<sup>1)</sup> A. Ellinger, Ztschr. f. physiol. Ch. 43. 325. 1904. — E. Abderhalden, E. S. London u. L. Pincussohn, ebenda 62. 139. 1909. — A. Baumgarten, Verh. d. Gesellsch. deutsch. Naturf. u. Ärzte 1905. II. 2. 413 zit. n. Chem. Zentralbl. 1906 II. 1449. — A. Hauser, Arch. f. exper. Pathol. u. Pharm. 36. 1. 1895. — P. Solomin, Ztschr. f. physiol. Ch. 23. 497. 1897.

<sup>2)</sup> A. Ellinger, Ber. d. chem. Gesellsch. 39. 2517. 1906.



(Lit. bei Josephsohn, Mendel und Jackson, Mendel und Schneider), finden in diesem Zusammenhange ihre Erklärung; Ernährung mit Fleisch — auch mit ausgelaugtem — vermehrt, Milch- und namentlich Brotfütterung vermindert die Kynurensäuremenge (Naunyn und Riess, Aug. Schmidt, Rubner, Brysch); nach Leimfütterung verschwindet die Säure. Exstirpation des Pankreas und Unterbindung der Pankreasgänge führen zur Verminderung (Glaessner und Langstein)<sup>1)</sup>, Vergiftungen durch Phloridzin, Phosphor und Borax, die mit erhöhtem Eiweisszerfall einhergehen, zur Vermehrung (Mendel und Jackson). Fäulnisvorgänge im Darm sind ohne unmittelbaren Einfluss (Baumann, Haagen, Capaldi).

B. Eigenschaften. 1. Die mit 1 Mol. Wasser krystallisierende Säure bildet sehr feine, farblose, in trockenem Zustand seidenglänzende Nadeln. Beim Aufbewahren unter schwach saurem Wasser verwandeln sich diese in lange, vierseitige, glasglänzende Prismen. In kaltem Wasser ist sie so gut wie nicht, in heissem zu 0,1% löslich. Sie löst sich in 500 Teilen kaltem Alkohol (Schneider); heisser Alkohol löst sie in nicht unbeträchtlicher Menge und lässt sie beim Erkalten teilweise wieder ausfallen; auch in Äther ist sie etwas löslich. Die Krystalle geben ihr Krystallwasser erst bei 150° vollständig ab (Schmiedeberg und Schultzen, Kretschy)<sup>2)</sup>.

2. Die Kynurensäure löst sich leicht in Alkalihydraten und kohlensauen Alkalien, indem sie mit den Basen Salze bildet; ihre Verbindungen mit den übrigen Basen sind schwer löslich oder unlöslich. Von den Salzen sind das Kali-, das Kalk-, das Baryt- und Kupfersalz krystallisiert erhalten worden (Liebig<sup>3)</sup>, Kretschy); die beiden erstgenannten krystallisieren schwer, leicht dagegen das charakteristische Barytsalz; das Ammonsalz verliert beim Verdunsten seiner Lösung das Ammoniak.

a) Das Barytsalz  $(C_{10}H_6NO_3)_2Ba + 3 H_2O$  (Schmiedeberg u. Schultzen, +  $4\frac{1}{2} H_2O$  Kretschy), wird erhalten, wenn man Kynurensäure in heissem Barytwasser auflöst, die Lösung mit Kohlensäure neutralisiert, die Flüssigkeit samt Niederschlag zum Sieden erhitzt, heiss filtriert und das Filtrat zur Krystallisation verdunstet; ebenso erhält man das Salz durch Kochen der Säure mit kohlensaurem Baryt und Wasser. Es bildet dreieckige, übereinander geschichtete, glänzende Plättchen oder Nadeln, reagiert neutral und verliert sein Krystallwasser erst bei 150—160° völlig. Das Salz löst sich schwer in kaltem, leichter in heissem Wasser,

<sup>1)</sup> A. Josephsohn, Beiträge zur Kenntnis der Kynurensäure-Ausscheidung beim Hunde. Inaug.-Diss. Königsberg 1898. — L. B. Mendel and H. C. Jackson, Amer. Journ. of physiol. **2**. 1. 1898. — L. B. Mendel und E. C. Schneider, ebenda **5**. 427. 1901. — J. W. Brysch, Untersuchungen über das Vorkommen der Kynurensäure im Katzenharn. Inaug.-Diss. Bern 1907 zit. n. Jahresb. f. Tierch. **37**. 350. — K. Glaessner u. L. Langstein, Hofmeisters Beiträge **1**. **34**. 1902.

<sup>2)</sup> O. Schmiedeberg u. O. Schultzen, Ann. d. Chem. u. Pharm. **164**. 155. — M. Kretschy, Monatshefte f. Ch. **2**. 57. 1881.

<sup>3)</sup> Liebig, a. a. O. u. **108**. 354.

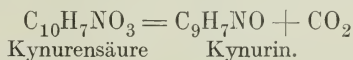
noch leichter in Barytwasser; beim Neutralisieren dieser alkalischen Lösung fällt kynurensaurer Baryt aus. Durch Säuren wird das Salz zersetzt, aber nach Meissner, Liebig<sup>1)</sup>, sowie Schmiedeberg und Schultzen nicht durch Kohlensäure.

b) Eine ammoniakalische Lösung der Kynurensäure gibt mit salpetersaurem Silber einen dicken weissen, in der Wärme nicht löslichen Niederschlag (Liebig), in welchem bald Reduktion eintritt, wenn die Säure nicht rein ist (Schneider, Kretschy); der Niederschlag löst sich leicht in überschüssigem Ammoniak (Huppert). — Kynurensaurer Baryt gibt mit essigsaurem Blei sowie mit Chlorzink weisse, im Überschuss des Reagens lösliche Niederschläge, mit essigsaurem Kupfer einen gelbgrünen, krystallinischen, mit salpetersaurem Quecksilberoxyd einen weissen, mit Eisenchlorid einen ziegelroten, mit Platinchlorid einen hellgelben Niederschlag (F. Hofmeister, Kretschy).

3. Die Kynurensäure verbindet sich auch mit Säuren. In salpetersäure- und in salzsäurehaltigem Wasser löst sie sich so gut wie nicht, dagegen löst sie sich leicht in den Mineralsäuren bei nur mässiger Verdünnung derselben, ebenso ohne Veränderung in konzentrierten Mineralsäuren, wenn die Anwendung von Wärme vermieden wird; Wasser fällt die Kynurensäure aus ihren Lösungen in den Säuren wieder aus. Von den Verbindungen der Kynurensäure mit Säuren ist das salzsaure Salz,  $C_{10}H_7NO_3$ , HCl, von Brieger dargestellt worden; auch ein Platinchloridsalz scheint zu bestehen (Kretschy). Von Bedeutung ist die Verbindung der Kynurensäure mit der Phosphorwolframsäure wegen ihrer Schwerlöslichkeit.

Nach F. Hofmeister<sup>2)</sup> gibt eine Lösung von Kynurensäure bei Gegenwart einer freien Mineralsäure, aber nicht bei Gegenwart von Essigsäure, mit Phosphorwolframsäure einen Niederschlag von rhombischen Täfelchen. Der Niederschlag bildet sich sofort noch bei einer Verdünnung der Lösung der Kynurensäure von 1:4000; bei einer Verdünnung von 1:12000 entsteht zunächst schwache Trübung, und nach 24 Stunden haben sich Kryställchen abgesetzt; bei einer Verdünnung von 1:16000 bleibt die Flüssigkeit anfangs klar, scheidet aber binnen 24 Stunden auch noch Krystalle ab.

4. Beim Erhitzen im Glasrohr schmilzt die Kynurensäure zu einer braunen Flüssigkeit, welche endlich unter Zurücklassung einer Spur Kohle vollständig sublimiert; das Sublimat ist weiss, seidenglänzend, krystallinisch und löst sich leicht in Alkohol (Liebig). Nach Schmiedeberg und Schultzen schmilzt die Kynurensäure bei 265° und zerfällt dabei (bei 253—258° nach Kretschy) sogleich in Kohlensäure und eine organische Basis, das Kynurin; auch das Kalksalz liefert bei schwachem Glühen Kynurin (Kretschy).



Nach der von Wenzel<sup>3)</sup> ausgeführten Synthese ist das Kynurin  $\gamma$ -Oxychinolin.

<sup>1)</sup> G. Meissner u. Shepard, Untersuchungen über das Entstehen der Hippursäure etc. Hannover 1866. 203. — Liebig, a. a. O. 140. 143.

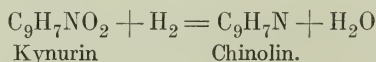
<sup>2)</sup> F. Hofmeister, Ztschr. f. physiol. Ch. 5. 70. 1881.

<sup>3)</sup> F. Wenzel, Monatshefte f. Ch. 15. 469. 1894.

Der Schmelzrückstand löst sich bis auf einen kleinen Rest Kohle leicht in Wasser, und aus der mit Tierkohle entfärbten Lösung krystallisiert das Kynurin in glashellen, zu Drusen vereinigten Prismen. Die Krystalle sind wasserfrei, luftbeständig, von neutraler oder schwach alkalischer Reaktion, lösen sich wenig in kaltem Wasser, leichter in kaltem Alkohol, schwerer in absolutem Äther, Petroleumäther, Benzol und binden bei längerem Stehen an der Luft etwas Kohlensäure. Das Kynurin schmeckt rein bitter, wie Chinin, nur lange nicht so intensiv. Bei 201° schmilzt es zu einer farblosen Flüssigkeit und erstarrt beim Abkühlen plötzlich bei 159—160°. Es hat nur geringe Neigung zu sublimieren. — Wenn Kynurin aus seiner wässerigen Lösung plötzlich auskrystallisiert, so tritt es in Nadeldrusen mit 3 Mol. Krystallwasser auf; diese Krystalle verwittern schnell und schmelzen in ihrem Krystallwasser bei ungefähr 52°. — Eisenchlorid färbt die Lösung des Kynurins schwach carminrot, Eisenvitriol schwach gelblich, Millon'sches Reagens allmählich intensiv gelbgrün. Das Kynurin wird gefällt durch Pikrinsäure, salpetersaures Silber, Platinchlorid und Goldchlorid; die Chloridniederschläge sind in Alkohol erheblich löslich. Mit Säuren gibt das Kynurin stark sauer reagierende, gut krystallisierende Verbindungen. Salzsäure bildet mit ihm ein normales Salz  $C_9H_7NO, HCl + H_2O$  (Schmiedeberg und Schultzen) und ein basisches  $(C_9H_7NO)_2, HCl + 2 H_2O$  (Kretschy); Skraup erhielt beide; beide krystallisierten in Nadeln. Das Platinsalz,  $(C_9H_7NO)_2, H_2PtCl_6 + 2 H_2O$ , bildet einen schwefelgelben, krystallinischen Niederschlag oder orangegelbe Nadeln. Das Goldchloridsalz besteht aus grünlichgelben Nadeln. — Mit Benzoylchlorid trocken am Rückflusskühler auf 200° erhitzt, geht Kynurin in  $\gamma$ -Chlorchinolin über (Ellinger u. Riesser<sup>1)</sup>).

5. Anhaltendes Kochen der Kynurensäure mit Salpetersäure verändert sie nicht. Ihre Lösung in konzentrierter Schwefelsäure bräunt sich beim Erwärmen schwach, und scheidet auf Zusatz von Wasser einen zitronengelben, amorphen Niederschlag ab (Liebig). — Konzentrierte Jodwasserstoffsäure verwandelt die Säure bei 180° im zugeschmolzenen Rohr in kompakte Prismen, ohne sie sonst zu verändern (Schmiedeberg und Schultzen). — Wird die Kynurensäure mit konzentrierter Salzsäure auf 240° erhitzt, so gibt sie nach Kretschy<sup>2)</sup> unter Kohlensäureentwicklung salzsaures Kynurin.

6. Wird Kynurensäure mit Zinkstaub im Wasserstoffstrom erhitzt, so liefert sie nach Kretschy<sup>3)</sup> unter Kohlensäureentwicklung fast ganz reines Chinolin:



7. Beim Schmelzen mit Kalihydrat verbrannte die Kynurensäure nach Kretschy grösstenteils ohne Ammoniakentwicklung und ohne dass ein Zwischenprodukt gefasst werden konnte.

8. In alkalischer Lösung werden die Kynurensäure und das Kynurin zu Kynursäure (Carbostyrilsäure, Ortho-Oxamidobenzoessäure,

<sup>1)</sup> Zd. H. Skraup, Monatshefte f. Ch. **9**. 818. 1888; **10**. 728. 1889. — A. Ellinger u. O. Riesser, Ber. d. chem. Gesellsch. **42**. 3336. 1909.

<sup>2)</sup> M. Kretschy, Ber. d. ch. Gesellsch. **12**. 1674. 1879; Monatshefte f. Ch. **2**. 84. 1881.

<sup>3)</sup> M. Kretschy, Ber. d. ch. Gesellsch. **12**. 1674; Monatshefte f. Ch. **2**. 79.



Oxalyl-Orthoamidobenzoessäure  $\text{COOH} \cdot \text{CO} \cdot \text{NH} \cdot \text{C}_6\text{H}_4 \cdot \text{COOH}$ ) oxydiert (Kretschy).

9. Erhitzt man Kynurensäure mit Salzsäure und chlorsaurem Kali, so entsteht nach Jaffe<sup>2)</sup> neben anderen Produkten Tetrachloroxykynurin:  $\text{C}_9\text{H}_3\text{Cl}_4\text{NO}_2$ . Dasselbe färbt sich in dünner Schicht, mit Ammoniak übergossen, erst mahagonibraun, allmählich aber dunkelgrün, später fast schwarzblau.

10. Lösungen von Kynurensäure geben auf Zusatz von Bromwasser einen starken, zitronengelben Niederschlag, der bald krystallinisch wird (Baumann). Der Niederschlag zersetzt sich nach L. Brieger<sup>3)</sup> leicht unter Abgabe von Kohlensäure, die aber nur in der Wärme vollständig ist, und verwandelt sich in Tetrabromkynurin:  $\text{C}_9\text{H}_3\text{Br}_4\text{NO}$ .

Das Tetrabrom-Kynurin enthält ein Atom Brom locker gebunden; dasselbe wird zwar nicht durch Schütteln der Verbindung mit kaltem Wasser frei, wohl aber unter der Einwirkung von Alkohol oder von Alkalihydraten sowie beim Erwärmen der Verbindung für sich; der in Wasser zerteilte Niederschlag gibt mit Jodkaliumkleister sofort blaue Färbung. Das Tetrabrom-Kynurin wäre also den entsprechenden Parakresol- und Phenolverbindungen analog und als Tribromkynurin-Brom,  $\text{C}_9\text{H}_3\text{Br}_3\text{N} \cdot \text{OBr}$ , zu betrachten.

Das Tetrabrom-Kynurin löst sich mit gelber Farbe in Alkohol; beim Kochen der Lösung entweicht unter Abnahme der gelben Färbung Bromäthyl und Bromwasserstoff, und aus der Lösung krystallisieren beim Verdunsten weisse Nadeln von Tribrom-Kynurin,  $\text{C}_9\text{H}_4\text{Br}_3\text{NO}$ . Dasselbe löst sich leicht in heissem, schwer in kaltem Alkohol, gar nicht in Wasser, dagegen in den Alkalihydraten und fällt aus diesen Lösungen auf Zusatz von Säure.

Auch Kynurin gibt mit Bromwasser einen flockigen Niederschlag, der jedoch nicht krystallinisch, sonst aber der gelben Verbindung aus Kynurensäure sehr ähnlich ist. Beim Kochen mit Alkohol gibt dieser Niederschlag Brom ab und verwandelt sich gleichfalls in Tribromkynurin.

Mit Ammoniak färbt sich das Tribromkynurin nicht grün (Jaffe).

C. Darstellung. Zur Darstellung der Kynurensäure ist frischer Hundeharn zu verwenden; wenigstens hat Hofmeister aus gefaultem Hundeharn nur eine auffällig geringe Ausbeute erhalten. Man verfährt in folgender Weise.

a) Dem Harn werden auf 100 cem 4 cem konzentrierte Salzsäure zugesetzt und die Flüssigkeit 48 Stunden stehen gelassen (Voit), wobei auch Schwefel (aus der Thioschwefelsäure) ausfallen kann.

b) Man dampft den Harn entweder direkt oder nach der Fällung mit Bleizuckerlösung und Entfernung des überschüssigen Bleis durch Schwefelwasserstoff auf ein Drittel ein, säuert mit Salzsäure oder Salpetersäure an und lässt tagelang an einem kühlen Orte stehen (Schmiedeberg und Schultzen).

c) Der Harn wird mit Kalkmilch alkalisch gemacht und auf ein kleines Volumen eingedampft. Aus dem abfiltrierten Rückstand fällt man die Kynurensäure durch Zusatz von Salzsäure bis zur stärker sauren Reaktion und lässt die

<sup>1)</sup> M. Kretschy, Monatshefte f. Ch. 4. 156. 1883; 5. 16. 1884.

<sup>2)</sup> M. Jaffe, Ztschr. f. physiol. Ch. 7. 399. 1883.

<sup>3)</sup> E. Baumann, Ztschr. f. physiol. Ch. 1. 62. 1877. — L. Brieger, Ztschr. f. physiol. Ch. 4. 89. 1880.



Flüssigkeit einige Tage stehen. Ein zu grosser Überschuss an Kalk muss vermieden werden, da sich sonst die Kynurensäure, besonders bei zu starkem Eindampfen, zum Teil zersetzt (Schneider<sup>1)</sup>).

d) Schmidt beschreibt das folgende von Jaffe angegebene Verfahren. Der Harn wird zum dicken Sirup eingedampft, mit frischem Alkohol ausgezogen und der Auszug 24 Stunden stehen gelassen. Dann wird die Lösung abfiltriert, der entstandene Niederschlag mit Alkohol nachgewaschen und die gesamte Flüssigkeit wieder zum Sirup eingedampft, dieser in Wasser gelöst und die Lösung nach dem Ansäuern mit verdünnter Schwefelsäure mit Äther ausgeschüttelt. Die Säure scheidet sich in gefärbten Krystallen teils an der Grenzschicht, teils am Boden des Kolbens ab. Sie wird abfiltriert, mit Wasser gewaschen, in Ammoniak gelöst und mit Säure vorsichtig wieder ausgefällt. Der in Alkohol unlösliche Anteil enthält keine Kynurensäure mehr. — Hauser<sup>2)</sup> hat das Verfahren dahin abgeändert, dass er aus dem alkoholischen Harnauszug die Kynurensäure direkt durch starkes Ansäuern mit Salzsäure fällt.

e) Es wird der Harn mit 0,1 Vol. konzentrierter Schwefelsäure, darauf abwechselnd mit Phosphorwolframsäure und Salzsäure versetzt, bis kein Niederschlag mehr entsteht, dieser mit auf das 20 fache verdünnter Schwefelsäure (durch Dekantieren) chlorfrei gewaschen, abgepresst, mit überschüssigem Baryumhydrat gekocht und die stark alkalische Lösung abfiltriert. Den überschüssigen Baryt kann man durch Kohlensäure entfernen. Man dampft dann auf ein kleines Volumen ein und versetzt mit Salzsäure bis zur stark sauren Reaktion (F. Hofmeister<sup>3)</sup>).

Von diesen Methoden gibt die von Hofmeister die beste Ausbeute, doch sind sie sämtlich mit einem kleinen Verlust an Kynurensäure verbunden, da bei Zusatz von zu wenig Säure Kynurensäure gelöst bleibt, bei Zusatz von zu viel, Kynurensäure wieder in Lösung gehen kann. Bromwasser gibt in solchem Falle mit dem Filtrat noch einen Niederschlag der Bromverbindung (B. 10, Baumann). Der Verlust an Kynurensäure wird um so grösser sein, je verdünnter die Lösung war, aus welcher sie gefällt wurde. Auch das vorläufige Füllen des Harns mit essigsauerm Blei (b) könnte einen Verlust an Kynurensäure nach sich ziehen (B. 2 b). Beim direkten Füllen des Harns mit Säure oder nach vorläufigem Eindampfen erhält man Flüssigkeiten, welche nur sehr langsam filtrieren und das Filter leicht verstopfen. Diese Übelstände werden wenigstens zum Teil vermieden bei der Methode e; ihr wesentlicher Vorzug besteht aber darin, dass man die Kynurensäure sogleich frei von Harnsäure erhält und von Schwefel, welcher sich bei Zusatz von Säure aus dem im Hundeharn häufig enthaltenen unterschwefligsauren Salz abscheidet.

In allen Fällen ist die Kynurensäure noch stark gefärbt und schon deshalb einer weiteren Reinigung zu unterziehen.

Der Schwefel lässt sich durch Waschen der trockenen Säure mit Schwefelkohlenstoff entfernen; den die Krystalle durchtränkenden Schwefelkohlenstoff entfernt man, ehe er verdunstet, durch Äther.

<sup>1)</sup> Schneider, Virchows Archiv 29. 583.

<sup>2)</sup> A. Schmidt, Über das Verhalten einiger Chinolinderivate im Tierkörper. Diss. Königsberg 1884. 9. — A. Hauser, Arch. f. exper. Pathol. 36. 5. 1895.

<sup>3)</sup> F. Hofmeister, Ztschr. f. physiol. Ch. 5. 67. 1881.

Um die Kynurensäure von beigemengter Harnsäure zu trennen, kocht man nach Meissner und Shepard den Niederschlag eine Weile mit kohlensaurem Baryt und Wasser, filtriert heiss und säuert das eingedampfte Filtrat mit Salzsäure an. Oder man digeriert den Niederschlag mit Ammoniak, wobei die Kynurensäure leicht in Lösung geht. Stadthagen<sup>1)</sup> entzog dem Gemenge die Kynurensäure durch heissen absoluten Alkohol.

Die völlige Entfernung des Farbstoffs bietet grosse Schwierigkeiten dar. Eines grossen Theils des Farbstoffes wird man von vornherein ledig, wenn man nach Hofmeister die rohe Kynurensäure in verdünntem Ammoniak löst und die braune Flüssigkeit tropfenweise mit essigsaurem Blei versetzt, bis ein mässig starker Niederschlag entstanden ist. Das Filtrat ist dann weingelb und gibt auf Zusatz von Säure eine nur wenig gefärbte Säure, deren Barytsalz unter gleichzeitiger Verwendung von Tierkohle aus schwachem Ammoniak umkrystallisiert wird.

Niggeler<sup>2)</sup> erhielt fast farblose Krystalle von Kynurensäure durch Füllen des Harns mit Bleiessig, Zerlegen des Niederschlags mit Schwefelwasserstoff und Filtrieren der heissen Flüssigkeit.

Nach Schmiedeberg und Schultzen erhält man die Kynurensäure rein, wenn man sie in Ammoniak löst, die Lösung mit Tierkohle entfärbt und mit Essigsäure fällen. Das Verfahren muss vielfach wiederholt werden. Die Säure scheidet sich dabei langsam in grösseren, platten Nadeln ab, während die essigsaure Mutterlauge jedesmal eine ziemlich beträchtliche Menge Farbstoff neben wenig Kynurensäure in Lösung behält. Schneider, der ein gleiches Verfahren benutzte, aber mit Salzsäure fällte, macht darauf aufmerksam, dass man die Krystalle bald von der Mutterlauge trennen und waschen muss, um eine Wiederaufnahme des Farbstoffs durch die Krystalle zu verhüten.

Takeda<sup>3)</sup> erhielt auf folgende Weise die Kynurensäure farblos; Er löste den kynurensäurehaltigen Niederschlag, der mit Schwefelsäure sich aus dem Harn ausschied, in starkem Ammoniak und fügte tropfenweise Bleizuckerlösung zu, bis die Flüssigkeit nur noch hellgelb gefärbt war. Von der Fällung wurde abgesaugt, der Niederschlag mit Ammoniak gewaschen, das Waschammoniak mit der zuerst abgesaugten Flüssigkeit vereinigt und mit Schwefelsäure angesäuert, wobei die Kynurensäure rein weiss ausfiel. Enthält das Filtrat vom Bleiniederschlag überschüssiges Blei, so muss man dieses mit einigen Tropfen Ammonsulfid entfernen. Mit dem Zusatz von Bleizucker muss man vorsichtig sein, damit nicht kynurensaures Blei mit ausfällt und so Verluste entstehen.

Bereitung der Phosphorwolframsäure. Für viele Zwecke genügt ein Präparat, welches man erhält, wenn man eine heisse Lösung von 250 g wolframsaurem Natron mit so viel Phosphorsäure versetzt, bis die Flüssigkeit mit Salzsäure keinen flockigen Niederschlag mehr gibt. Die Lösung wird auf 1 Liter aufgefüllt. Diese rohe Säure schlägt aber manche Substanzen nicht oder nicht so vollkommen nieder, wie rein dargestellte Säure.

Ein vorzügliches Präparat erhält man nach einer von Kehrman u. Freinkel<sup>4)</sup> gegebenen Vorschrift, die man, nach Hupperts Erfahrungen, in folgender Weise ausführt. Es werden 1 kg wolframsaures Natron und 150 g krystallisiertes phosphorsaures Natron, jedes für sich, aufgelöst, die Filtrate vermischt, bis zur Krystallhaut eingedampft und nach und nach mit 1 Liter Salzsäure von 1,12 Dichte vermischt. Nach dem Erkalten wird der entstandene Niederschlag von phosphorwolframsaurem Natron auf einem Trichter abgesogen, in dessen Spitze man eine Glaskugel gelegt hat. Die Mutterlauge lässt sich, wie die direkt aus Wolframat

<sup>1)</sup> G. Meissner u. C. U. Shepard, Untersuchungen über das Entstehen der Hippursäure im tierischen Organismus. Hannover 1866. 203. — Stadthagen, Virchows Archiv **109**. 418.

<sup>2)</sup> R. Niggeler, Archiv f. exper. Pathol. **3**. 70. 1875.

<sup>3)</sup> K. Takeda, Pflügers Archiv **133**. 395. 1910.

<sup>4)</sup> Kehrman u. Freinkel, Ber. d. chem. Gesellsch. **24**. 2326. 1891.

und Phosphorsäure erhaltene Säure, zu Reaktionen verwenden. Die abgesogenen Krystalle werden in heissem Wasser gelöst, auf das Kilo (der Krystalle) mit einer heiss gesättigten Lösung von 120 g krystallisiertem Chlorbaryum vermischt und die Lösung wieder bis zur Krystallhaut eingedampft. Nach dem Erkalten wird das Barytsalz abgesogen und wenigstens zweimal umkrystallisiert. Hierbei lässt sich das Salz chlorfrei erhalten. Der Baryt wird aus der siedenden Lösung durch Schwefelsäure gefällt, wozu auf das Kilo Barytsalz 220 cem 10 fach verdünnter Schwefelsäure erforderlich sind. Nach dem Erkalten filtriert man und dampft zur Krystallisation ein. Nach der Rechnung soll die Ausbeute 73% des wolframsauren Natrons betragen; es werden aber nur ungefähr 70% der berechneten Menge erhalten. — Man muss ein gutes Präparat von wolframsaurem Natron verwenden; es kommt Wolframat im Handel vor, welches sich zu verarbeiten nicht lohnt.

In Gegenwart von Mineralsäure werden durch die Phosphorwolframsäure niedergeschlagen ausser der Kynurensäure die Xanthinbasen und die Harnsäure, das Kreatinin und das Arginin, die Diaminofettsäuren und die Diamine (Putrescin etc.), Thetinkörper, Harnfarbstoffe, (Urochrom), die Eiweisskörper, das Glycogen und das Amylodextrin, ferner von anorganischen Substanzen das Kali und das Ammoniak. Diese letzteren beiden Salze sind in kaltem und heissem Wasser so gut wie unlöslich; das Ammonsalz ist feinpulverig und geht leicht auch durch ein dichtes Filter. Durch Baryum- oder Calciumhydrat im Überschuss lässt sich die Säure vollständig abscheiden.

D. N a c h w e i s. Zum Nachweis von Kynurensäure im Harn direkt ist das Bromwasser, obwohl ein empfindliches Reagens auf Kynurensäure, nicht verwendbar, weil der Harn noch andere Substanzen (Phenole usw.) enthält, welche mit Brom einen gelben Niederschlag geben; es wird daher aus jedem Hundeharn mit Brom ein gelber amorpher, sich schlecht absetzender und schlecht filtrierender Niederschlag erhalten (Baumann, Brieger).

Dagegen dient für den Nachweis der Kynurensäure die Krystallform des Niederschlags, der auf Zusatz von Salzsäure oder Essigsäure zu dem Hundeharn entsteht (B. 1), die Krystallform des Barytsalzes (B. 2 a), welche sehr charakteristisch und für sich allein schon beweisend ist, ferner bei Abwesenheit anderer sich ähnlich verhaltender Substanzen die Bildung eines zitronengelben, beim Stehen bald krystallinisch werdenden Niederschlags auf Zusatz von Bromwasser zu einer Lösung der Säure (B. 10), und endlich die Bildung von rhombischen Täfelchen auf Zusatz von Phosphorwolframsäure zu einer selbst sehr verdünnten, mit Salzsäure angesäuerten Lösung der Säure. Alle diese Reaktionen werden jedoch an Empfindlichkeit und Sicherheit durch die von Jaffe angegebene, auf der Bildung von Tetrachloroxykynurin (B. 9) beruhende, übertroffen.

Die Probe wird mit Salzsäure und chlorsaurem Kali auf dem Wasserbad oder vorsichtig über der freien Flamme verdunstet. Bei Gegenwart von Kynurensäure wird der rötliche Rückstand nach dem Befeuchten mit Ammoniak zunächst grünbraun und nach kurzer Zeit smaragdgrün. Die Stärke der Färbung nimmt beim Stehen an der Luft erheblich zu. Beim Erwärmen geht das Grün in schmutzig violett über. Diese Reaktion, bei welcher die Nebenprodukte des Tetrachloroxykynurins mehr beteiligt zu sein scheinen als dieses selbst, gelingt mit minimalen



Mengen Kynurensäure um so schöner, je reiner die Säure ist, doch ist sie auch mit der gefärbten rohen Säure sehr deutlich. Kein anderer normaler Harnbestandteil gibt diese Probe.

Die milchige Trübung, welche Hundeharn auf Zusatz von Säure annimmt, ist kein Anzeichen der Kynurensäure, sondern rührt von dem Schwefel her, welcher aus der unterschwefligen Säure abgeschieden wird.

E. Bestimmung. Capaldi<sup>1)</sup> hat nach folgenden Methoden untersucht, wieviel von 0,05—0,12 g Kynurensäure, welche 100 ccm Hundeharn in ammoniakalischer Lösung zugesetzt worden war, wiedergefunden wurde.

Bei 1—2 b war der Harn, dem die zu ermittelnde Menge Kynurensäure zugesetzt wurde, frei von Kynurensäure, bei 3 wurde die schon vorhandene Kynurensäure nach 2 a und 3 bestimmt.

1. Verfahren von Schmiedeberg und Schultzen (C. b).

2 a) Eine Abänderung des Verfahrens von Jaffe (C. d). Der eingedampfte Harn wurde so oft mit heissem Alkohol ausgezogen, bis das Filtrat farblos ablief. Der Alkohol wurde verdunstet, der Rückstand in ungefähr 30 ccm Wasser gelöst, mit 4%iger Salzsäure versetzt und 24 Stunden stehen gelassen.

2 b. Die nach 2 a abgeschiedene Kynurensäure wurde in Ammoniak gelöst und wieder mit Salzsäure gefällt.

Die bei 1—2 erhaltenen Niederschläge wurden nach 24 Stunden nacheinander mit Wasser, Schwefelkohlenstoff und Äther gewaschen, getrocknet und gewogen. Die Säure war immer gefärbt.

3. Eigenes Verfahren. Der Harn wurde mit dem halben Volumen einer mit 5%igem Ammoniak versetzten 10%igen Chlorbaryumlösung vermischt, das Filtrat auf ungefähr 30 ccm eingedampft, mit 4%iger Salzsäure versetzt, der Niederschlag nach 16—24 Stunden abfiltriert, mit 1%iger Salzsäure gewaschen, in ein Becherglas gespritzt und in Ammoniak gelöst. Die Lösung wurde auf dem Wasserbad vom freien Ammoniak befreit, filtriert und wieder mit 4%iger Salzsäure versetzt. Nach etwa 6 Stunden wurde der nun weisse Niederschlag mit 1%iger Salzsäure und zweimal mit Wasser gewaschen, bei 100° getrocknet und gewogen.

Nach 1 wurde von der zugesetzten Kynurensäure im Mittel 94,5%, nach 2 a 104,5%, nach 2 b 96,45%, nach 3 mit dem kynurensäurehaltigen Harn 96,8% und nach 2 a 101,1%, wiedergefunden. Solomin<sup>2)</sup> fand nach dem Verfahren von Capaldi von 0,210 g Kynurensäure, welche 480 ccm Harn zugesetzt worden waren, 0,2079 g (99%) wieder.

#### Lithursäure.

Vorkommen. Die Lithursäure wurde bisher nur einmal beobachtet; sie ist von G. Roster<sup>3)</sup> in rundlichen Konkrementen aufgefunden worden, welche von schwer arbeitenden Ochsen, die hauptsächlich die saftigen Stengel von blühendem Mais als Futter erhielten, von Zeit zu Zeit mit dem Harn entleert wurden. Der grösste der Steine wog 1,02 g, der kleinste 0,15 g. Sie waren sehr leicht, schwammen indes auf Wasser nicht. Ihre Farbe war ein helles Strohgelb von zuweilen graulicher Nuance. Auf den Bruchflächen zeigten sie keine Schichtung, aber deutlich krystallinische Struktur. Zwischen den Fingern liessen sie sich nicht zer-

<sup>1)</sup> A. Capaldi, Ztschr. f. physiol. Ch. 23. 92. 1897.

<sup>2)</sup> P. Solomin, Ztschr. f. physiol. Ch. 23. 498. 1897.

<sup>3)</sup> G. Roster, Ann. d. Ch. 165. 404.



drücken, aber sehr leicht im Mörser pulvern. Die Bruchstücke bestanden aus durchsichtigen, der Hippursäure ähnlichen Prismen, dem Magnesiumsalz der Lithursäure; daneben waren noch Spuren kohlensaurer Kalk und etwas Mucin vorhanden.

Eigenschaften. Der Säure kommt nach der Analyse des Magnesiumsalzes die Formel  $C_{29}H_{38}N_2O_{17}$ , oder vielleicht  $C_{15}H_{19}NO_9$  zu. Sie scheidet sich aus der warm gesättigten Lösung des Magnesiumsalzes nach Zusatz von Salzsäure beim Erkalten in schneeweißen, seidenglänzenden, feinen Nadeln ab, die bei  $204-205^{\circ}$  schmelzen, sich in siedendem Wasser ziemlich, in siedendem Alkohol leicht, in den kalten Flüssigkeiten bedeutend schwerer lösen.

Das Magnesiumsalz  $C_{29}H_{36}MgN_2O_{17}$  oder vielleicht  $(C_{15}H_{18}NO_9)_2Mg$  — die Analyse stimmt besser zur ersten Formel — wurde durch Umkrystallisieren der Konkreme aus heissem Wasser gewonnen. Durchsichtige, seidenglänzende, klinorhombische Prismen mit je zwei zuspitzenden Flächen an den Enden. Das Salz löst sich in siedendem Wasser ziemlich leicht, schwerer in kaltem Wasser, nicht in Alkohol oder in Äther. Auf dem Platinblech schwärzt es sich, schmilzt, verbrennt fast ohne Flamme und verbreitet dabei den Geruch des verbrennenden Zuckers. Beim Kochen mit Kalilauge entwickelt es kein Ammoniak, wohl aber beim Glühen mit Natronkalk.

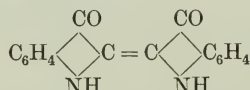
## Farbstoffe, die den Indolkern enthalten.

### I. Indigblau.



Syn.: Indigo, Indigotin.

Dass dem Indigoblau die Formel



zukommt, ist durch die klassischen Arbeiten von A. Baeyer<sup>1)</sup> aus den Jahren 1866 bis 1869 und 1878—1884 bewiesen.

A. V o r k o m m e n. Beim Stehen scheidet sich in manchen Harnen, wie schon Galen erwähnt, spontan Indigo ab. (Historisches siehe bei Maillard, L'indoxyle urinaire Paris 1903, S. 90 ff.) Der blaue Farbstoff ist mit den verschiedensten Namen bezeichnet worden (s. Indoxyl S. 797). Die Erscheinung hat später in der leichten Zersetzlichkeit der gepaarten Indoxylverbindungen, namentlich der Indoxylglycuronsäure (s. S. 803) ihre Erklärung gefunden. Es wurden auch Fälle beobachtet, bei welchen der frisch entleerte Urin ein Sediment von Indigoblau absetzte (Wolff, Phedran und Goldie, Reale, Wang, Dixon Mann)<sup>2)</sup>. Auch in Harnsteinen ist Indigoblau von Ultzmann und von Ord gefunden worden (s. Harnsedimente 13 a). Die

<sup>1)</sup> A. v. Baeyer, Zur Geschichte der Indigo-Synthese. Ber. d. chem. Gesellsch. 33. Sonderheft S. 41. 1900.

<sup>2)</sup> H. Wolff, Über Indigurie, Inaug.-Diss. Berlin 1887, dort Lit. — Phedran u. Goldie, Brit. med. Journ. 1901. Okt. zit. n. Jahresb. f. Tierch. 32. 786. — Reale, La nuova riv. clinico-therapeut. 5. 121. 1902. zit. n. Jahresb. f. Tierch. 32. 818. — E. Wang, Festschr. f. E. Salkowski, Berlin 1904. S. 397. — J. Dixon-Mann, Medic. Chronicle 1905. 361. zit. n. Jahresb. f. Tierch. 35. 830.

Zersetzung und Oxydation der Indoxylglycuronsäure zu Indigo dürfte wohl zuweilen durch Bakterienwirkung in der Blase bei cystitischen Prozessen erfolgen. In dem Falle von Wang, der zur Sektion kam, scheint sich der Farbstoff in der tuberkulösen linken Niere gebildet zu haben. Auch Daremberg und Perroy beobachteten Indigurie bei Tuberkulösen im Magenharne. In mehreren von den acht Fällen, die Wolff anführt, lagen ebenfalls Nierenerkrankungen vor, ebenso in einem Fall von Bogdanow-Beresowsky<sup>1)</sup>, in dem die Indigomenge 3,3 g (?) betragen haben soll.

B. Eigenschaften. 1. Das Indigoblau bildet ein dunkelblaues amorphes Pulver oder mikroskopische Krystalle. Das sich aus Harn absetzende erscheint öfter in feinen gekrümmten, sternförmig angeordneten Nadeln oder Plättchen; aus manchen Lösungsmitteln krystallisiert es in Nadeln oder Tafeln. In dichten Massen zeigt das amorphe Indigotin, namentlich auf dem Striche, ebenso wie die Krystalle, einen kupferroten Metallglanz. Es sublimiert mit violetter, jodähnlichen Dampf, der sich krystallinisch verdichtet.

Sein Dampf zeigt nach Rosin<sup>2)</sup> nicht bloss das Absorptionsspektrum des Indigblaus, sondern daneben auch das des isomeren Indigrots, und dem Sublimat lässt sich auch dann durch Äther Indigrot entziehen, wenn reines Indigblau zu dem Versuch verwendet wurde.

2. In Wasser ist das Indigoblau unlöslich. Chloroform löst es schon in der Kälte, Alkohol in der Wärme in nicht unbedeutender Menge, Äther dagegen nur in Spuren.

Auch löst es sich in der Wärme in Methylalkohol, Amylalkohol, Benzol, Nitrobenzol, Phenol, Anilin, ätherischen und fetten Ölen, und krystallisiert aus einigen dieser Lösungsmittel beim Erkalten wieder aus.

3. Sehr fein verteilter, in Wasser suspensierter Indigo zeigt nach Vierordt ein schlecht begrenztes Absorptionsband im Rot zwischen a und B 25 C; in dickeren Schichten verbreitert sich das Band bis C 10 D, und dann erscheint noch ein zweites, sehr schwaches, gleichfalls schlecht begrenztes Absorptionsband im Grün zwischen D 50 E und D 77 E. Wie das suspendierte Indigoblau verhalten sich nach Stokvis<sup>3)</sup> auch seine Lösungen in indifferenten Flüssigkeiten.

Die Indigblauschwefelsäure oder ihre Salze absorbieren nach Vierordt das äusserste Rot am wenigsten, die Absorption nimmt schnell zu, und es tritt im Orange, zwischen C 65 D und C 90 D ein Absorptionsband auf; dann sinkt die Absorption wieder kontinuierlich bis zum violetten Ende des Spektrums, die Absorption im Blau ist dabei aber etwa 12 mal so stark wie im Rot.

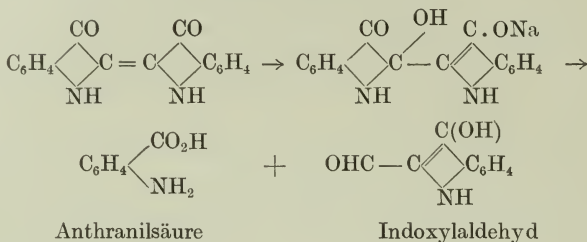
4. Verdünnte Säuren oder Alkalien greifen das Indigoblau nicht an. Konzentrierte Schwefelsäure verbindet sich mit ihm zu Monosulfosäure (Phönicin- oder

<sup>1)</sup> Auch Daremberg et Ph. Perroy, Bull. de l'Acad. de méd. d. Paris [3] 55, 702. 1907; zit. nach Jahresb. f. Tierch. 36. 319. — M. Boydanow-Beresowsky, Wratsch. 1897. Nr. 25; zit. nach Jahresb. f. Tierch. 27. 742.

<sup>2)</sup> H. Rosin, Virchows Archiv 123. 561. 1891.

<sup>3)</sup> C. Vierordt, Ztschr. f. Biologie 10. 31. 1874; 11. 187. 1875. — B. J. Stokvis, Chem. Zentralbl. 1871. 36.

Purpurschwefelsäure), deren Salze in trockenem Zustand rot, in Lösung blau sind; rauchende Schwefelsäure liefert Disulfosäure (Cörolin- oder Indigblauschwefelsäure), deren Salze in Lösung wie in trockener Form blau sind. — Sehr konzentrierte Kalilauge verwandelt es nach Heumann und Bachofen leicht in Indoxyl. — Nach Friedländer und Schwenk<sup>1)</sup> entsteht bei der Kalischmelze aus Indigoblau neben Indoxyl Anthranilsäure und Indoxylaldehyd:



5. Oxydierende Substanzen, wie Chlor, Salpetersäure, entfärben das Indigotin unter Bildung von Isatin und Abkömmlingen desselben; andere Oxydationsmittel (übermangansaures Kali etc.) entfärben das Indigoblau gleichfalls. Bei gleichzeitiger Gegenwart anderer oxydabler Substanzen, wie gewisser Harnbestandteile (Harnstoff etc.), erfolgt diese Oxydation des Indigos weniger leicht. Dieselbe Farbenveränderung erleiden auch die Phönicin- und die Indigblauschwefelsäure.

6. Bei Gegenwart von alkalischen Substanzen (Kalilauge, Calciumhydrat) und leicht oxydierbaren Körpern (Alkalisulfide, Zink, Zinn, Eisen, Eisenvitriol, Zinn-oxydul, Traubenzucker, Harn) wird das Indigotin unter Wasserstoffaufnahme zu Indigweiss,  $\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_2$ , das sich bei Zutritt von Luft wieder in Indigoblau verwandelt (Indigküpe).

C. N a c h w e i s. In welcher Weise Indigoblau aus Harn dargestellt und nachgewiesen wird, ist bei Indoxyl S. 805 angegeben. Zum Nachweis desselben in blauen Sedimenten und in Harnsteinen digeriert man sie zunächst mit verdünnter Salzsäure, wäscht auf dem Filter mit Wasser, trocknet das Filter und zieht es mit Chloroform aus. Die Lösung untersucht man spektroskopisch.

Urobilin lässt sich aus der Chloroformlösung durch Schütteln derselben mit verdünntem Alkali entfernen, Indigrot durch Behandeln des Abdampfungsrückstandes mit Äther, welcher das Indigrot viel leichter löst als das Indigoblau.

Lässt sich das blaue Pulver leicht vom Filter ablösen, so kann man es auch in konzentrierter Schwefelsäure lösen und die Lösung der spektroskopischen Untersuchung unterwerfen.

Um Verwechslungen mit Methylenblau, das als Arzneimittel oder zu diagnostischen Zwecken gegeben ist, zu vermeiden, prüft man nach Beddard<sup>2)</sup> am besten das Chloroformextrakt des Urins spektroskopisch. Methylenblau gibt ein schmales dunkles Band im Rot, so dass schon mit einem Taschenspektroskop die Unterscheidung vom Indigoblau möglich ist. Als weitere Unterscheidungsmerkmale führt Beddard an: Äther nimmt Indigo, aber nicht Methylenblau auf.

<sup>1)</sup> K. Heumann u. F. Bachofen, Berichte der chem. Gesellsch. **26**. 225 1893. — P. Friedländer u. E. Schwenk, ebenda **43**. 1971. 1910.

<sup>2)</sup> A. P. Beddard, Guys Hospital Reports **56**. 127. 1902.

Methylenblau entfärbt sich im Urin in geschlossener Flasche leicht durch Reduktionswirkung von Bakterien, Indigo viel langsamer. — Beim Erhitzen einer Urinprobe mit starker Salzsäure verschwindet die Methylenblaufärbung schnell, kehrt aber beim Schütteln mit Luft wieder, Indigo verändert sich nicht mit Salzsäure.

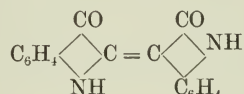
## II. Rote Farbstoffe.

### Indigorot.

Syn. Indirubin.



Das Indigorot, das sich in dem Pflanzenindigo stets neben dem isomeren Indigoblau findet, ist synthetisch aus Isatin und Indoxyl von Baeyer erhalten worden, der es als Indogenid des Isatins (s. Indoxyl S. 802) erkannte und ihm die Formel



zuwies. Diese Konstitutionsformel ist neuerdings durch Wahl und Bagard bestätigt, und die Einwände von Maillard <sup>1)</sup> gegen die Baeyersche Formel sind von ihnen zurückgewiesen worden.

A. Vorkommen. Das Indigorot ist, wie das Indigoblau, ein Zeretzungsprodukt der Indoxylschwefelsäure und der Indoxylglykuronsäure und ist bei jeder Bildungsweise immer von Indigoblau begleitet. Es entsteht aus der Indoxylschwefelsäure bei der Einwirkung nicht oxydierender Säuren (Salzsäure, Schwefelsäure) auf Harn, sowie bei der gleichzeitigen Behandlung des Harns mit Säuren und Oxydationsmitteln, mit Salpetersäure allein bei der Rosenbachschen Probe, mit Salzsäure und Chlorkalk bei der Jaffeschen Indicanprobe, in beiden Fällen reichlicher in der Wärme als in der Kälte, und bildet sich manchmal bei der alkalischen Harn gärung allein oder doch vorwiegend aus der Indoxylglykuronsäure. Bei der Harn gärung scheidet es sich in fester Form aus dem Harn ab. Unter der Einwirkung von Säure, mit oder ohne Oxydation, auf den Harn kann zugleich Urorosein entstehen.

Über die Bildungsweisen der Indoxylverbindungen ist bei diesen berichtet. Dem Indigorot ähnliche Farbstoffe stellten Niggeler nach dem Einverleiben von Isatin  $\text{C}_8\text{H}_5\text{NO}_2$ , sowie Masson und Nencki <sup>2)</sup> nach der Zufuhr von Oxindol  $\text{C}_8\text{H}_7\text{NO}$  und Dioxindol  $\text{C}_8\text{H}_7\text{NO}_2$  direkt aus dem Harn dar.

<sup>1)</sup> A. Baeyer, Ber. d. chem. Gesellsch. **16**. 2188. 1883. — A. Wahl u. P. Bagard, Bull. Soc. Chim. d. France [4] **7**. 1090. 1910 u. **9**. 56. 1911. — L. C. Maillard ebenda **5**. 1153. 1910 u. L'indoxyle urinaire Paris 1903. S. 34; s. auch A. Ellinger, Ztschr. f. physiol. Ch. **41**. 30. 1903.

<sup>2)</sup> Niggeler, Archiv f. exper. Pathol. **3**. 72. 1875; Nencki, Berichte d. chem. Gesellsch. **7**. 1594. 1874.



Das durch nichtoxydierende Säuren entstehende Indigrot ist von Heller Urrhodin, von Plosz Urorubin benannt und von beiden zuerst näher untersucht worden. Weitere Literaturangaben über rote Harnfarbstoffe, die vermutlich mit Indigrot identisch waren, findet man bei Maillard. — Mit der Untersuchung der bei der Rosenbachschen Reaktion entstehenden Farbstoffe hat sich Rosin eingehend beschäftigt. — Das Auftreten eines roten Farbstoffs neben Indigblau bei der Indicanprobe ist von Jaffe selbst beobachtet worden; die Anwendung von Bromwasser oder Eisenchlorid statt Chlorkalk hat denselben Erfolg (Rosin). Fälle (Typhus, Icterus), in welchen das Indigrot dabei in auffällig grossen Mengen auftrat, haben Fr. Müller und Krukenberg beschrieben. — Beobachtungen über die Bildung von Indigrot bei der Fäulnis von (meist eiweisshaltigem) Harn sind veröffentlicht worden von Nencki und Niggeler, von Plosz und von Rosin. In Harnsteinen ist es von Heller, in einem Nierenstein von Ord, in einem anderen, von Chiari beschriebenen, von Hofmeister nachgewiesen worden. Reale hat das Vorkommen von krystallisiertem Indirubin als Harnsediment beschrieben und Gröber<sup>1)</sup> berichtet von einem rosaroten Urin, aus dem durch Extraktion mit Chloroform oder Äther Indigrot erhalten wurde.

Nach Rosin entsteht es in grösserer Menge in Harnen, welche bei der Rosenbachschen Probe burgunderfarben werden, also bei schweren Darmerkrankungen (Ileus, Brucheinklemmung, gewisse Formen von schwerer Diarrhöe), bei schweren Ernährungsstörungen (manchen Formen der Phthise, Krebskachexie, bei vielen Kranken gegen das Lebensende). Aber auch bei vielen anderen Krankheiten, welche die Rosenbachsche Reaktion nicht gut geben, tritt es reichlich auf. Choleraharn liefert es nach Thudichum und nach Wyss<sup>2)</sup> in grosser Menge. Aus normalen Harnen lassen sich nur Spuren darstellen. Da die Menge des gebildeten Indigrot nicht bloss abhängig ist von der Menge der Indigobildner, sondern auch von der Art der Zersetzung dieser, so haben solche Bestimmungen nur einen bedingten Wert. Aus indicanreichen Tierharnen (Rinder, besonders Pferde) kann es nach Rosin in grosser Menge gewonnen werden.

B. Eigenschaften. 1. Nach der Untersuchung von Rosin ist das Indigrot identisch mit dem im rohen Indigo enthaltenen, von Schunck Indirubin benannten roten Farbstoff, und nach Schunck und Marchlewski<sup>3)</sup> dieses wieder identisch mit dem von Baeyer durch Reduktion des Isatinchlorids erhaltenen Indigpurpurin und mit der von Baeyer dargestellten und gleichfalls als Indirubin bezeichneten Verbindung von Isatin mit Indoxyl. Indigrot ist isomer mit Indigblau.

<sup>1)</sup> Heller, dessen Archiv 1845. 170; 1846. 536. 539. — P. Plósz, Ztschr. f. physiol. Ch. 8. 85. 1883. — O. Rosenbach, Berliner klin. Wochenschr. 1. 13. 17. 22. 23. 1889. — H. Rosin, Zentralbl. f. klin. Med. 29. 1889. 505; Virchows Archiv 123. 519. 1891. — Jaffe, Virchows Archiv 70. 73. 1877. — Krukenberg, Verhandlungen der physik.-med. Gesellsch. zu Würzburg [2] 18. 192. 1884. — M. Nencki, Berichte d. chem. Gesellsch. 7. 1593. 1874. — Niggeler, Archiv f. exper. Pathol. 3. 70. 1875. — Plósz, Ztschr. f. physiol. Ch. 6. 504. 1882. — Rosin, Virchows Archiv 123. 538. — Heller, dessen Archiv 1846. 21. — Ord, Berliner klin. Wochenschr. 15. 365. 1878. — Chiari, Prager med. Wochenschr. 50. 1888. 541. — E. Reale, La nuova Rivista Clinico-Terapeut. 7. 505. 1904 zit. n. Jahresb. f. Tierch. 34. 924. — A. Gröber, Münchener med. Wochenschr. 51. 61. 1904.

<sup>2)</sup> Rosin, Virchows Archiv 123. 535. — Thudichum, Ninth Report of the med. officer of the privy council 1866 u. Tenth Report 1867. 188. — O. Wyss, Archiv f. Heilkunde 9. 237. 1868.

<sup>3)</sup> E. Schunck u. L. Marchlewski, Berichte d. chem. Gesellsch. 28. 540. 1895.

2. Es krystallisiert (auch aus Harn) in schokoladebraunen, oft sternförmig angeordneten Nadeln oder in rhombischen Plättchen mit Kupferglanz; im durchfallenden Licht erscheinen die Krystalle granatrot. Das amorph abgeschiedene Indigrot besitzt eine kirschrote Farbe. Die Substanz beginnt ohne vorher zu schmelzen, bei  $295-310^{\circ}$  zu sublimieren und sublimiert vollständig bei  $340^{\circ}$  mit violettem Dampf und charakteristischem Indiggeruch; der Dampf kondensiert sich zu feinen Nadeln, zum Teil auch braunen Körnchen.

3. Das Indigrot ist unlöslich in Wasser, verdünnter Salzsäure und Schwefelsäure, in Alkalien, in Benzol, Ligroin, Petroläther, löst sich dagegen in Methyl-, Äthyl-, Amylalkohol, in Äther, Essigäther, Aceton, Chloroform, Benzol, Phenol, Nitrobenzol, Anilin, Paraffin, ätherischen Ölen (namentlich in der Wärme), heissen fetten Ölen; Eisessig oder Essigsäureanhydrid lösen den Farbstoff leicht. Konzentrierte Schwefelsäure löst es als Sulfosäure.

Diese Lösungen besitzen eine kirschrote Farbe; ein Stich ins Blaue rührt nach Schunck und Marchlewski von beigemischtem Indigblau her und verschwindet mit diesem.

Die Löslichkeit des Indigrots ist nicht bedeutend. In kaltem Chloroform löst es sich wenig, in siedendem Chloroform leichter als in Alkohol und in diesem besser als in Äther. Es krystallisiert leicht aus den heiss gesättigten Lösungen in Chloroform, Äther, Anilin beim Erkalten. Bei dem Verdünnen seiner Lösung in Alkohol oder in Eisessig mit Wasser, oder der Lösung in Chloroform mit dem doppelten Volumen Ligroin scheidet es sich krystallinisch ab. Bei raschem Verdunsten seiner Lösungen wird es amorph erhalten (Rosin). — Seinen Lösungen in Chloroform oder Äther kann es durch Alkalilösungen (auch Ammoniak) nicht entzogen werden.

4. Spektrum. Konzentrierte Lösungen absorbieren das Spektrum von D bis F 23 G (bis Blau), wobei auch das violette Ende erheblich verdunkelt ist. Der Streifen ist gegen das Gelb hin verwaschen. Verdünntere Lösungen bieten eine auf beiden Seiten schmalere Absorption dar, die aber auch in schwachen Lösungen noch eine beträchtliche Ausdehnung besitzt (D 12 E — E 65 F).

5. Durch Salzsäure wird das Indigrot selbst in der Wärme nicht verändert. In konzentrierter Schwefelsäure löst es sich unter Bildung von Indigrotschwefelsäure.

Die Lösung ist anfangs schmutzig grauschwarz oder braunviolett, nimmt bei einigem Stehen eine schönere Farbe an und wird beim Erhitzen bedeutend heller und feurig kirschrot. Sie gibt dasselbe Spektrum wie die Lösungen des Indigrot selbst. Die Säure lässt sich mit Soda neutralisieren, ohne ihre Farbe zu verlieren; sie selbst und ihre Alkalisalze lösen sich nach Rosin auch in Alkohol, aber nicht in Äther und in Chloroform. Aus der verdünnten Lösung scheidet Kochsalz dunkelviolette Flocken ab. Seide und Wolle färbt sie purpurn und echt, auch Baumwolle färbt sie; durch überschüssiges Alkali wird sie zersetzt.

6. Oxydationsmittel zerstören das Indigrot, doch ist es beständiger als Indigblau.

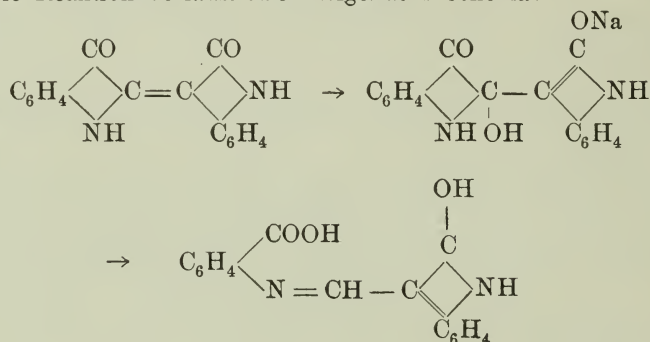
Kalte konzentrierte Salpetersäure löst Indigrot mit purpurner Farbe, die Lösung wird aber (in der Wärme) rot und gelb, wie es scheint unter Bildung von

Pikrinsäure. Königswasser, Chlorkalk und Salzsäure, Kaliumchromat und Schwefelsäure oxydieren gleichfalls. Setzt man einer alkoholischen Lösung Alkali hinzu, so wird sie, nach Schunck und Marchlewski, mit der Zeit braunrot, dann nach und nach blasser und farblos, unter Bildung von Isatin; Wasserstoffsuperoxyd beschleunigt diese Oxydation.

Beim Kochen des Indigrots mit Lauge entsteht nach Rosin ein brauner Körper.

Friedländer und Schwenk<sup>1)</sup> erhielten beim Kochen von Indirubin mit konzentrierter wässriger Natronlauge auf 150° das krystallinische, in Wasser sehr schwer lösliche Natriumsalz der Säure  $C_{16}H_{12}N_2O_3$ , die aus Nitrobenzol in langen glänzenden gelblichen Nadeln vom Schmelzpunkt über 295° krystallisiert und ein Kondensationsprodukt von  $\alpha$ -Oxyindol- $\beta$ -aldehyd und Anthranilsäure darstellt.

Die Reaktion verläuft nach folgendem Schema:



7. In Berührung mit den alkalischen Lösungen reduzierender Substanzen (Traubenzucker, Zinkstaub, Zinnoxidul) bildet das Indigrot eine farblose Lösung von Indirubinweiss, welche an der Luft wieder rot wird, gibt also, wie Indigblau, eine Küpe.

Die Ausscheidung von Indigrot aus gefaultem Harn bei Luftzutritt ist eine ganz analoge Erscheinung.

Saure Reduktionsmittel (Zinn und Salzsäure, Eisessig und Zinkstaub) entfärben das Indigrot auch, wobei zunächst wieder Indirubinweiss entsteht. Bei weiterer Reduktion bildet sich aber nach Forrer<sup>2)</sup> ein an der Luft farblos bleibender, krystallisierender Körper, das Indileucin.

### C. Darstellung.

1. Nach Plósz<sup>3)</sup>. Kocht man Harn 10–20 Minuten mit 5–10%iger Salzsäure, so scheidet sich neben Indigo auch Urorubin ab. Man schüttelt den braungewordenen Harn mit Äther oder Chloroform, destilliert das Lösungsmittel ab, wäscht den Rückstand mit heissem Wasser, löst in Äther, wobei etwas Indigo zurückbleibt und entfernt einen Rest Urobilin durch Schütteln mit sehr verdünnter Natronlauge. Der Äther hinterlässt eine dunkel kirschrote, spröde, undeutlich krystallinische Masse; bei sehr langsamem Verdunsten der ätherischen, besser der alkoholischen Lösung erhält man mikroskopische, rhombische Plättchen.

<sup>1)</sup> P. Friedländer u. E. Schwenk, Ber. d. chem. Gesellsch. **43**. 1973. 1910.

<sup>2)</sup> Forrer, Berichte d. chem. Gesellsch. **17**. 977.

<sup>3)</sup> P. Plósz, Ztschr. f. physiol. Ch. **8**. 85.



2. Nach Rosin<sup>1)</sup>. Indicanreicher Harn wird mit basisch essigsaurem Blei ausgefällt, aus dem Filtrat das überschüssige Blei mit Salzsäure entfernt, die abermals filtrierte Flüssigkeit auf das Liter mit ungefähr 20 g Salpetersäure versetzt und sofort in einem grossen Kolben zum Sieden erhitzt, wobei sie erst dunkelbraun, dann violett und endlich kirschrot wird. Jetzt wird, um die Oxydation des gebildeten Indigrots durch die Salpetersäure zu verhüten, die Flüssigkeit schnell abgekühlt und mit Natriumcarbonat in Substanz bis zu schwach saurer Reaktion versetzt. Der sich bildende Niederschlag, welcher aus Indigrot neben Indigblau und brauner Substanz besteht, wird auf einem Filter mit kohlensaurem Natron, darauf mit Wasser gewaschen und nach dem Trocknen so oft mit Chloroform ausgekocht, bis es sich nicht mehr purpurn, sondern blau färbt. Man destilliert dann so viel Chloroform ab, bis die Flüssigkeit ihre kirschrote Farbe verloren hat und rein braun geworden ist, bringt nach dem Erkalten das ausgefallene Indigrot auf ein Filter und wäscht es mit Chloroform. Wenn dieses nicht mehr braun, sondern schön purpurn abfließt, wird der Niederschlag zur Entfernung des Indigblaus und des Restes brauner Substanz so oft mit Äther ausgekocht, als dieser noch rein rot wird, dann der Äther abdestilliert, bis sich Krystalle abzuscheiden beginnen. Nach 24 Stunden werden diese abfiltriert. Durch nochmaliges Umkrystallisieren aus Äther erhält man das Indigrot analysenrein. — Die Ausbeute ist sehr gering; aus 300 Liter indicanreichem Harn gewinnt man kaum mehr als 1 g Farbstoff. — Normalen Harn dampft man vor dem Ausfällen mit dem Bleisalz zweckmässig auf ein Zehntel ein.

D. Nachweis. Das Indigrot kann mit dem gleichfalls bei der Einwirkung von Säure allein oder Säure und Oxydationsmittel auf Harn entstehenden Urorosein verwechselt werden. Um diese zwei Farbstoffe zu trennen, neutralisiert man den Harn und schüttelt ihn (im Reagenzglas) mit Äther aus, welcher das Indigrot aufnimmt, das Urorosein aber nicht. Färbt sich der Äther dabei rot, so untersucht man die Lösung spektroskopisch. Man verdunstet darauf den Äther und behandelt den Rückstand mit Alkohol, welcher Indigrot mit schön roter Farbe aufnimmt; erwärmt man diese Lösung mit etwas Natriumcarbonat und Traubenzuckerlösung, so verliert sie ihre rote Farbe, wenn Indigrot zugegen war, und nimmt sie beim Schütteln mit Luft wieder an.

Vom Skatolrot unterscheidet sich das Indigrot durch die Unlöslichkeit des Skatolrots in Äther und Chloroform.

Harnsedimente, Harnsteine, mit Säure aus dem Harn gefällte Harnsäure sind blau oder amethystrot gefärbt, wenn sich Indigblau und Indigrot mit abgeschieden haben; ihnen kann man das Indigrot direkt mit Äther entziehen, oder man behandelt sie mit Alkohol, dampft die Lösung ein und extrahiert den Rückstand mit Äther.

Bei der Behandlung indicanreichen, eiweisshaltigen Harns mit Salpetersäure scheidet sich das Eiweiss mit violetter Farbe ab (Heller); aus diesem Niederschlag lässt sich das Indigrot in derselben Weise gewinnen, wie aus den Sedimenten.

Um das Indigrot in dem Chloroform nachzuweisen, welches bei der Jaffeschen Indicanprobe die Indigfarbstoffe aufgenommen hat, wäscht man nach Rosin das Chloroform zur Entfernung brauner Substanzen mit verdünntem Ammoniak oder Natriumcarbonat, verdunstet das Chloroform und zieht den Rückstand mit Äther aus.

Vom Indigblau lässt sich das Indigrot am besten durch Äther trennen; dieser nimmt das Rot viel besser auf, als das Blau. — Dem Indigrot beigemengtes Urobilin lässt sich ihm durch Schütteln der Lösung beider Farbstoffe mit verdünnter Lauge entziehen.

<sup>1)</sup> Rosin, a. a. O. 539.



### Urorosein.

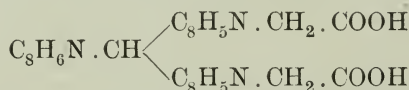
Nencki und Sieber<sup>1)</sup> beobachteten in etwa 10% der von ihnen untersuchten pathologischen Harne folgende Farbstoffreaktion: Der Harn gab, in der Kälte mit  $\frac{1}{10}$  Volum 25%iger Schwefel- oder Salzsäure versetzt, eine rötliche bis rosarote Färbung. Der Farbstoff ging in Amylalkohol, färbte Wolle und gab einen charakteristischen Absorptionsstreifen zwischen D und E, genau an der gleichen Stelle wie der Streifen der käuflichen Fuchsinulfosäure. Diesen Farbstoff nannten Nencki und Sieber Urorosein.

Später hat sich Rosin<sup>2)</sup> mit dem Farbstoff beschäftigt. Da aber Rosins kurze Angaben sich auf Farbstoffe beziehen, die zum Teil aus Harnen mit Säure und Oxydationsmitteln, zum Teil auch erst bei höherer Temperatur gewonnen waren, so ist es zweifelhaft, ob Rosin bei seinen Untersuchungen, über die er nur zusammenfassend berichtet hat, stets denselben Farbstoff vor sich hatte, und ob man seine Angaben auf das Urorosein beziehen darf.

Herter hat schliesslich den Beweis erbracht, dass zum prompten Auftreten der Uroroseinreaktion nach Nencki und Sieber die gleichzeitige Anwesenheit von Nitriten und Indolessigsäure im Harn nötig ist, nachdem Steensma schon gelegentlich auf die Rotfärbung nitrithaltiger Harne mit Salzsäure hingewiesen und Salkowski<sup>3)</sup> die Möglichkeit betont hatte, dass das Urorosein ein aus der Indolessigsäure stammender Farbstoff sei.

Da nach diesen Beobachtungen angenommen werden darf, dass als Urorosein der durch Einwirkung von Nitriten und Salzsäure auf Indolessigsäure entstehende rote Farbstoff zu bezeichnen ist, hat Riesser diesen Farbstoff näher untersucht.

Nach den leider nicht ganz eindeutigen Resultaten von Riesser<sup>4)</sup> — der Farbstoff konnte bisher nicht krystallisiert erhalten werden — ist das Urorosein wahrscheinlich als ein Trinidylmethanfarbstoff aufzufassen, dessen Leucoverbindung die Formel



zukommt. Andere Oxydationsmittel wie Eisenchlorid scheinen beim

<sup>1)</sup> M. Nencki und N. Sieber, Journ. f. prakt. Ch. [2] 26. 333. 1882.

<sup>2)</sup> H. Rosin, Deutsche med. Wochenschr. 1893. 51.

<sup>3)</sup> C. A. Herter, Journ. of biol. chem. 4. 239 u. 253. 1908. — E. H. Steensma, Nederl. Tijdschr. voor Geneesk. 1904. II. 425, zitiert nach Jahresber. f. Tierch. 34. 421. — E. Salkowski, Zeitschr. f. physiol. Ch. 42. 216. 1904.

<sup>4)</sup> O. Riesser, Zur Chemie des Uroroseins. Königsberger Inaug.-Diss. Berlin 1911.

Erwärmen zur Bildung des gleichen Farbstoffes zu führen, wobei dann aber mehr Nebenprodukte entstehen.

A. Vorkommen. Das Urorosein kommt nach Nencki und Sieber nicht als solches, sondern als Chromogen im Harn vor, und entsteht aus diesem erst nach Zusatz einer Mineralsäure, nach Rosin unter gleichzeitiger Oxydation, in kurzer Zeit. Es findet sich nach Rosin in geringer Menge in jedem normalen Harn, nach Garrod und Hopkins nur manchmal, ferner nach Rosin reichlicher namentlich bei Konsumptionskrankheiten, nach Garrod<sup>1)</sup> oft auch im Harn Chlorotischer. Bei Pflanzenkost tritt es in grösserer Menge auf als bei Fleischkost (R), sehr viel enthält der Harn der Pferde und noch viel mehr der der Rinder (R).

Nencki und Sieber vermissten es im normalen Harn, wiesen es aber nach bei Diabetes, Chlorose, Osteomalacie, Nephritis, Typhus, Carcinoma oesophagi, Ulcus ventriculi, Perityphlitis, und Rosin in vermehrter Menge bei Carcinom der verschiedensten Organe, bei Magenerweiterung und anderen erheblicheren Magenkrankungen, perniziöser Anämie, selten bei hochgradiger einfacher Chlorose, bei Typhus im späten Stadium und bei hochgradiger Lungentuberkulose. Wechselmann bestätigte im wesentlichen die Befunde von Rosin. — Einen Farbstoff von denselben Löslichkeitsverhältnissen haben Brandl und Pfeiffer<sup>2)</sup> in einem melanotischen Harn aufgefunden; er unterschied sich aber dadurch vom Urorosein, dass er Eisen enthielt und ein anderes Spektrum darbot (einmal den Urobilin-streifen, weil er mit Urobilin verunreinigt war und einmal zwei Streifen, deren Dunkelheitsmaximum nach der Bestimmung von G. Krüss bei  $\gamma$  586,1 und bei  $\gamma$  535,6 lagen).

Zu diesen Angaben über das Auftreten der Urorosein-Reaktion ist, abgesehen von dem erwähnten Einwande gegen die Untersuchungen von Rosin, die auch für die Arbeit von Wechselmann gelten, folgendes zu bemerken: Das prompte Auftreten der Uroroseinreaktion ist der Ausdruck des gleichzeitigen Vorkommens von Indolessigsäure und Nitriten (vielleicht auch anderer oxydierenden Substanzen) im Harn. Durch einen Überschuss von Nitriten im Vergleich zu der vorhandenen Menge Indolessigsäure kann die Reaktion gestört werden. Die Frage nach der Bedeutung der Urorosein-Reaktion läuft also auf die andere ebenfalls noch nicht klar zu beantwortende Frage hinaus: Unter welchen Bedingungen kommen Nitrite und Indolessigsäure im Harn vor (s. S. 148 und S. 863)? Dabei ist besonders zu beachten, ob die Reaktion im frisch entleerten Harn zustande kommt oder erst nach längerem Stehen, während dessen Bakterien Gelegenheit gehabt haben aus Nitraten des Harns Nitrite zu bilden. Für den Ausfall der Reaktion in Harnen, die

<sup>1)</sup> Rosin, Virchows Archiv **123**. 556. 1891. — Garrod und Hopkins, Journ. of Physiol. **20**. 135. 1896. — Garrod, Edinburgh med. Journ., Aug. 1897. 116.

<sup>2)</sup> A. Wechselmann, Beiträge zur Kenntnis des Uroroseins und seines klinischen Verhaltens. Inaug.-Diss. Berlin 1906. — J. Brandl und L. Pfeiffer, Zeitschr. f. Biol. **26**. 375. 1890.

gestanden haben, muss natürlich der Nitratgehalt des Harns bzw. der Nahrung (Pflanzenkost s. Rosin) von Einfluss sein. Dass in einem frischen Harn die Uroroseinreaktion nach Nenckis Vorschrift positiv ausfällt, ist bisher nicht erwiesen. Es ist sehr wohl denkbar, dass durch bestimmte bakterielle Zersetzungen im Darm eine gleichzeitige Bildung und Ausscheidung von Indolessigsäure und Nitriten herbeigeführt werden kann, so wie die gleichzeitige Bildung von Indol und Nitriten durch den Choleraerreger bekannt ist. Eine solche diagnostische Verwertung der Uroroseinreaktion wäre noch festzustellen.

B. Eigenschaften. 1. Das Urorosein löst sich in mässigem Grade mit roter Farbe in Wasser und verdünnten Säuren, leicht in Äthyl- und Amylalkohol sowie in Eisessig, schwer in Essigäther; Äther, Chloroform, Benzol, Schwefelkohlenstoff nehmen es aus seinen wässerigen Lösungen nicht auf, wohl aber Amylalkohol. Die Lösungen färben Wolle. Aus den wässerigen Lösungen lässt sich der Farbstoff aussalzen (Riesser).

2. Die alkoholische Lösung weist einen schmalen, aber scharf begrenzten Absorptionsstreifen bei  $\lambda$  557 (D 48 E) auf.

In konzentrierten Lösungen lässt der Farbstoff nur Rot und Orange durch, absorbiert das Licht also ähnlich wie Indigrot; beim Verdünnen der Uroroseinlösung verschwindet aber die Verdunkelung des violetten Endes des Spektrums, und es bleibt dann der schmale Streifen in Grün übrig, während das Indigrot-Spektrum beim Verdünnen der Lösung im ganzen blasser wird und kein isoliertes Band zurücklässt.

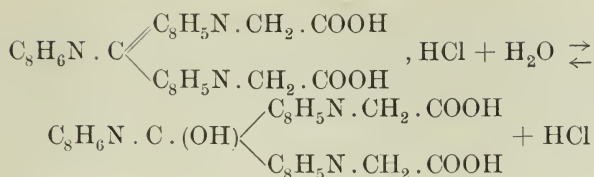
Fuchsin zeigt bei starker Verdünnung dieselbe Farbennuance, doch liegt der Absorptionsstreifen mehr nach Violett. Käufliche Fuchsin-Sulfosäure weist in alkoholischer Lösung genau den gleichen Streifen auf, wie das Urorosein, obwohl beide Farbstoffe nicht identisch sind.

3. Ammoniak, die fixen Alkalihydrate und die kohlensauren Alkalien lösen den Farbstoff unter Bildung gelb gefärbter Salze. Mineralsäuren machen den Farbstoff, ohne Mitwirkung von Oxydationsmitteln sofort wieder frei; organische Säuren zerlegen aber die Verbindung nicht.

Die ammoniakalischen Lösungen des Farbstoffes, aus denen das überschüssige Ammoniak vertrieben ist, geben mit Calcium, Barium und Kupfersalzen schwer lösliche Fällungen (Riesser).

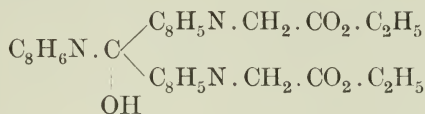
4. Wird der salzsaure Farbstoff, wie er durch Einwirkung von Nitrit und konzentrierter Salzsäure erhalten wird, anhaltend mit Wasser gewaschen, so verliert er seine Salzsäure und nimmt eine kolloidale Beschaffenheit an.

Wahrscheinlich entsteht dabei aus dem Farbsalz durch Dissoziation eine Carbinolverbindung:



(Riesser).

5. Durch Einleiten von gasförmiger Salzsäure in die alkoholische Lösung des Farbstoffes entsteht ein Ester, der in Alkalien unlöslich ist. Die Analyse des durch Eingiessen der salzsauren alkoholischen Lösung in wässriges Ammoniak gefällten Esters gibt Zahlen, die annähernd auf die Verbindung



stimmen (Riesser).

6. Durch Reduktion mit Zink oder Zinkstaub in saurer Lösung wird der Farbstoff schnell entfärbt. Die entstehende Leucoverbindung geht leicht in Äther (Riesser). Die ätherischen Lösungen ebenso wie die farblosen sauren Filtrate vom Zink färben sich schnell an der Luft wieder rot.

7. Ein Überschuss des Oxydationsmittels (Nitrit) zerstört den Farbstoff. Wahrscheinlich beruht auf dieser Tatsache die Angabe von Nencki und Sieber, dass der Farbstoff sehr unbeständig sei, wenn die Reaktion im Harn selbst angestellt wird (Herter, Riesser).

8. Bei der Spaltung von neutralen Uroroseinlösungen (Farbstoff mit Alkali neutralisiert) mit viel Wasser im Autoklaven bei 220° erhielt Riesser Indol und β-Indolaldehyd.

C. Darstellung. Nach Nencki und Sieber werden 50—100 ccm Harn mit 5—12 ccm 25%iger Schwefelsäure oder auch Salzsäure versetzt. Bei Gegenwart des Farbstoffes nimmt der Harn in einigen Minuten eine rötliche bis schön rosenrote Färbung an. Der Harn wird dann mit einigen ccm Amylalkohol nur wenig und gelinde geschüttelt, so dass sich keine Emulsion von Amylalkohol und Harn bildet und der Alkohol abgehoben. Die Scheidung des Amylalkohols erreicht man auch leicht, wenn man die Emulsion auf ein mit Amylalkohol befeuchtetes Filter bringt (Huppert).

Konzentriertere Lösungen erhält man in folgender Weise: Es werden 1—3 Liter uroroseinhaltiger Harn auf flachen Schalen im Wasserbad schnell auf die Hälfte eingedampft, die Flüssigkeit, nachdem sie auf etwa



30° erkaltet ist, mit Salzsäure oder verdünnter Schwefelsäure angesäuert, in den Harn entfettete Schafwolle gelegt und die Flüssigkeit mit essigsaurem Natron im Überschuss versetzt, wonach der Farbstoff von der Wolle fixiert wird. Die sorgfältig mit Wasser gewaschene Wolle wird an der Luft getrocknet und mit absolutem Alkohol, dem etwas Schwefelsäure zugesetzt ist, ausgekocht. Die so gewonnenen Lösungen sind verhältnismässig die reinsten und auch die haltbarsten; sie verblassen zwar auch allmählich, zeigen aber selbst noch nach Wochen den Absorptionsstreifen.

Nach Rosin soll sich auf folgende Weise das Chromogen des Uroroseins darstellen lassen:

Pferde- oder besser Rinderharn wird nach Rosin mit Bleizucker in Substanz gesättigt und das Filtrat mit Ammoniak im Überschuss versetzt, wobei das Chromogen grossenteils, aber nicht vollständig, gefällt wird. Die beiden Bleiniederschläge werden nach dem Trocknen bei ungefähr 70° so oft mit Alkohol ausgezogen, als die Lösung auf Zusatz von Salzsäure und einer Spur Chlor (Chloralkali oder Chlorwasser) noch rot wird. Die alkoholischen Auszüge werden mit Schwefelwasserstoff vom Blei befreit, im Wasserbad konzentriert und dann fraktioniert mit Äther gefällt, wobei sich Salze, ein gelber Farbstoff in öligen Tropfen und ein in Chloroform löslicher, harzartiger Körper abscheiden. In Lösung befinden sich dann noch neben dem Chromogen und etwas gelbem Farbstoff Phenole, die sich durch Extraktion der zur Trockne gebrachten Substanz mit Äther entfernen lassen. Die rückständige Substanz wird dann in möglichst wenig Alkohol gelöst und mit dem 8—10fachen Volumen Äther versetzt, worauf das Chromogen auskrystallisiert. Durch mehrfaches Umkrystallisieren lässt es sich rein erhalten.

Nach den Löslichkeitsverhältnissen kann das beschriebene Chromogen weder mit Indolessigsäure, noch mit der Leucoverbindung des Uroroseins, für deren Vorkommen im Harn bisher keine Anhaltspunkte vorhanden sind, identisch sein. Man muss deshalb wohl annehmen, dass den von Rosin isolierten Krystallen etwas Indolessigsäure oder etwas von dem Chromogen des Skatolrots angehaftet habe. —

Nach Garrod und Hopkins wird das Chromogen (Indolessigsäure?) auch beim Sättigen des Harns mit Ammonsulfat grossenteils gefällt. Der alkoholische Auszug des Niederschlages wird durch Säure rot und zeigt dann neben dem Uroroseinstreifen ein schwaches Urobilinband. Eine Trennung des Chromogens lässt sich bewerkstelligen, wenn man in dem Harn nur so viel Ammonsulfat löst, bis Trübung eintritt; diese rührt von dem Chromogen her, das Urobilin bleibt in der Lösung.

Auch hier ist eine Verwechslung mit dem Chromogen des Skatolrots nicht ausgeschlossen.

Über die Darstellung von Indolessigsäure aus Harn s. S. 866.

D. N a c h w e i s. Um Verwirrungen in den Angaben über rote Harnfarbstoffe vorzubeugen, sollte der Name Uroroseinreaktion der Reaktion, wie sie Nencki und Sieber angegeben haben (s. C.), vorbehalten bleiben und stets darauf geachtet werden, ob der Harn frisch oder erst nach dem Stehen die Färbung gibt.

Die spektroskopische Untersuchung ist unerlässlich, namentlich um Verwechslungen mit dem sehr ähnlichen Skatolrot zu vermeiden.

Die Unterscheidung vom Indigrot ist S. 885 besprochen.

Setzt man dem Harn ausser der Säure ein Oxydationsmittel zu, wie es bei den verschiedenen Indicanreaktionen der Fall ist (s. S. 805 ff.), so wird ein Gehalt von Indolessigsäure sich durch Bildung von Urorosein bemerklich machen.

### Skatolrot.

Eine systematische Beschreibung des Skatolfarbstoffes und seines Chromogens ist zurzeit trotz der zahlreichen Arbeiten über den Gegenstand noch unmöglich, weil in den älteren Versuchen (Brieger, Mester, s. S. 814) Verwechslungen mit Indigrot, in den späteren solche mit Urorosein nicht ausgeschlossen waren. Es seien deshalb hier nur die Arbeiten angeführt und einige noch unvollständige eigene Erfahrungen mitgeteilt. (Untersucht wurde das Skatolrot in den letzten Jahren von Roessler, Stokvis, Porcher und Hervieux, Grosser und Staal<sup>1</sup>.) Aus ihren Beobachtungen geht die grosse Ähnlichkeit des Skatolrots mit dem Urorosein hervor. Porcher und Hervieux erklären beide Farbstoffe sogar für identisch, was sich wohl nur dadurch erklären lässt, dass ihre Arbeit vor der Publikation Herters über Urorosein liegt, und dass sie nicht selbst Urorosein zum Vergleich in Händen hatten.

Gibt man einem Kaninchen, dessen Harn mit Zusatz von konzentrierter Salzsäure oder Obermeyerschem Reagens keine oder nur minimale Rotfärbung zeigt, einige Dezigramme Skatol ein, so färbt sich der Harn nach der Skatolfütterung mit beiden Reagentien, namentlich dem Obermeyerschen, intensiv rot, und nach einiger Zeit setzen sich dunkelrote Flocken ab.

Von den üblichen Ausschüttelungsmitteln nimmt nur Amylalkohol den roten Farbstoff in beträchtlicher Menge auf, in geringem Masse auch Essigäther; Chloroform und Äther bleiben fast ungefärbt. Der ausgefällte Farbstoff, der sich besser und vollständiger durch Salzsäure mit vorsichtigem Zusatz von 2%iger Nitritlösung abscheiden lässt, löst sich leicht auch in Alkohol, Eisessig und Aceton.

Der alkoholische Auszug oder die amylalkoholische Ausschüttelungsflüssigkeit geben einen scharf begrenzten Spektralstreifen zwischen der D- und E-Linie, dessen Lage Porcher und Hervieux zwischen

<sup>1</sup>) C. Roessler, Zentralbl. f. inn. Med. 22. 847. 1901. — B. J. Stokvis, Handelingen van het 8 Nederl. Natuur- en Geneesk. Congres 1901. 249, zitiert nach Jahresb. f. Tierch. 31. 445. — P. Grosser, Zeitschr. f. physiol. Ch. 45. 321. 1905. — Ch. Porcher et Ch. Hervieux, Compt. rend. Acad. Scienc. 138. 1723. 1904 und Zeitschr. f. physiol. Ch. 45. 486. 1905. — J. Ph. Staal, ebenda 46. 236. 1905.

λ 577 und 550 beschrieben haben. Ein Vergleich mit dem Uroroseinstreifen ergibt, dass der Skatolrotstreifen näher der D-Linie liegt.

Gegen Alkalien und gegen Reduktionsmittel verhält sich der Skatolfarbstoff genau wie das Urorosein. Als Unterscheidungsmerkmale sind bisher also nur anzuführen das spektroskopische Verhalten und die viel grössere Löslichkeit des Uroroseins in Wasser und Säuren.

Eines genaueren Studiums bedarf noch die von Jaffé (Privatmitteilung) gemachte Beobachtung, dass der, wie beschrieben, aus dem Harn gefällte rote Farbstoff schwefelhaltig ist. Nach Beobachtungen von Riesser und mir verliert der Farbstoff beim Umfällen aus ammoniakalischer Lösung mit Salzsäure Schwefelsäure. Löst man den Farbstoff in Ammoniak und fällt mit Salzsäure aus, so lässt sich in dem wenig gefärbten salzsauren Filtrat mit Chlorbarium Schwefelsäure nachweisen.

Der Farbstoff geht beim Stehen der Lösungen unter noch zu ermittelnden Einflüssen leicht in eine braune Substanz über, die den Spektralstreifen nicht mehr gibt.

Ob das Chromogen des Skatolfarbstoffes ein Bestandteil des normalen Menschen- und Tierharns ist, ist bisher wegen der schwierigen Unterscheidung kleiner Mengen von Urorosein und Skatolrot noch nicht festgestellt.

## Farbstoffe unbekannter Abstammung.

### Uroerythrin.

Der von Prout als rosige Säure, von Golding Bird als Purpurin bezeichnete Farbstoff der ziegelroten Uratsedimente ist von F. Simon zuerst Uroerythrin benannt worden. Die Kenntnis seiner Eigenschaften ist nach den dürftigen älteren, namentlich von Heller herrührenden Untersuchungen in neuerer Zeit namentlich von Zoja, von Riva und von A. Garrod<sup>1)</sup> erheblich erweitert worden.

A. Vorkommen. Das Uroerythrin ist ein sehr gewöhnlicher Harnbestandteil, es findet sich ungemein oft in normalen Harnen gelöst in geringer Menge; in vielen, namentlich fieberhaften Krankheiten und bei Erkrankungen der Leber kann es beträchtlich vermehrt sein.

Es findet sich auch in blassen Harnen; diese zeigen dann in dicker Schicht einen Stich ins Rote. Im Harnsediment Gesunder, mit Ausnahme der Kinder, findet es sich häufig (Garrod<sup>2)</sup>). Unter normalen Verhältnissen tritt es in

<sup>1)</sup> F. Simon, Handb. d. angewand. med. Ch. 1. 342. 1840. — Heller, dessen Archiv [2] 3. 361. 1854 (letzte Angaben). — L. Zoja, Zentralbl. f. d. med. Wissensch. 1892. 705; Archives ital. de Biol. 19. fasc. 3. 1893; Archivio ital. di clinica medica Anno 32. 1893. — A. Riva, Gaz. med. di Torino, Anno 43. Nr. 1 u. 47. 1892; Clinica medica di Torino, Estratto dall' Opera le Scuole italiane di clinica medica 1894. — Archibald E. Garrod, Journ. of Physiol. 17. 439. 1895.

<sup>2)</sup> Garrod, Edinburgh med. Journ., Aug. 1897. 114.



grösserer Menge auf nach starker Muskeltätigkeit, nach reichlichem Sch weiss. Selbst sehr geringfügige Verdauungsstörungen steigern seine Menge. Unmässigkeit im Genuss von Speisen und alkoholischen Getränken haben eine beträchtliche Vermehrung im Gefolge.

Unter pathologischen Verhältnissen ist das Uroerythrin vermehrt bei Krankheiten, in welchen eine Zirkulationsstörung der Leber stattfindet (Zoja), so bei Erkrankungen der Leber selbst (Schwellung und Zunahme der Konsistenz der Leber, Cirrhosis nach Alkoholmissbrauch und nach Malaria, Neubildungen), oder bei Herzfehlern und Lungenaffektionen (Pneumonie, Pleuritis), beim Bestehen von Unterleibstumoren; im Zusammenhang damit steht die Abnahme des Uroerythrins nach der Paracentese bei Ascites. In grösserer Menge erscheint es ferner bei akutem Gelenkrheumatismus, Influenza, Gicht, nach Hirnhämorrhagien (Riva). In nicht mit Lungenerkrankungen komplizierten Fällen von Typhus findet sich nur wenig (Riva, Zoja). Bemerkenswert ist die starke Abnahme und selbst das völlige Verschwinden desselben bei Lebercirrhose unter Milchdiät (Riva, Zoja). In einem Falle von Hämoglobinurie sah Riva nach dem Verschwinden des Hämoglobins viel Uroerythrin auftreten. Bei Nephritis kommt es fast nie vor.

Neben viel Uroerythrin findet sich gewöhnlich auch viel Urobilin vor (Riva).

**B. Eigenschaften.** 1. Das isolierte Uroerythrin ist in trockenem Zustand amorph, ziegel- oder krebserot, von etwas anderem Tone als die roten Uratsedimente; sehr reines zeigt nach Garrod rosenrote Farbe. Es besitzt ein sehr starkes Färbungsvermögen und man erhält deshalb aus Sedimenten nur wenig. Es besitzt, selbst in der Wärme, nur einen schwachen Geruch (Garrod). Beim Verbrennen hinterlässt es keine Asche, auch kein Eisen (Garrod).

Aus Chloroform scheidet sich der Farbstoff nach Riva beim Verdunsten mit Andeutungen von krystallinischer Beschaffenheit ab, aber bei langsamem Verdunsten der alkoholischen Lösung an der Luft erhielt Garrod kleine runde Körnchen, welche keine Spur einer krystallinischen Struktur besaßen.

2. Es löst sich am besten in Amylalkohol (Riva, Zoja), nicht viel schlechter in Essigäther (Garrod), weniger in absolutem Alkohol und in Chloroform, in geringer Menge in Wasser. Verdünnter Alkohol löst es besser als Wasser, aber schlechter als starker Alkohol. Äther löst es auch, aber schlechter als Alkohol, und der Farbstoff zersetzt sich in der Lösung leicht, selbst im Dunklen. Eine Spur Säure erhöht die Löslichkeit selbst in solchen Lösungsmitteln, welche den Farbstoff leicht aufnehmen (Garrod).

Sättigen einer Lösung mit Ammonsulfat oder Chlorammon in Gegenwart von harnsauren Salzen (Harn) schlägt den Farbstoff in Verbindung mit dem Ammonurat nieder (Garrod<sup>1)</sup>). Aus Lösungen, welche Erdalkaliphosphate enthalten (Harn), wird es auf Zusatz von Alkalihydrat mit diesen, aber in verändertem Zustande (grün) abgeschieden.

3. Die Lösungen besitzen je nach dem Gehalt an Farbstoff eine goldorange bis feuerrote Farbe; verdünnte Lösungen weisen nach

<sup>1)</sup> Garrod, Proceedings of the Roy. Soc. 55. 398. 1894 und Journ. of Physiol. 17. 443.



Garrod auch einen schwachen Stich in Blau auf. Sie zeigen keine Fluoreszenz, nach Garrod auch nicht im Lichte einer Geisslerschen Röhre, und nehmen auch, zum Unterschied von Urobilin, auf Zusatz von ammoniakalischer Zinklösung keine Fluoreszenz an (Riva, Zoja). Die Lösungen der reinen Substanz sind neutral oder eher etwas sauer (Garrod).

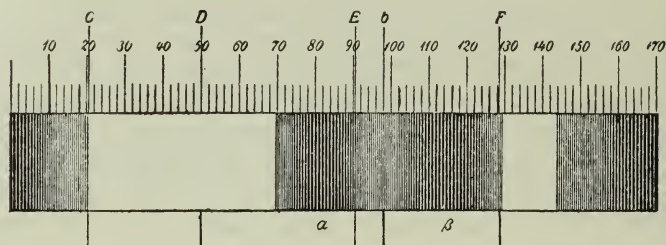


Fig. 41.  
Spectrum des Uroerythrins.

4. Spektrum. Eine sehr konzentrierte Lösung absorbiert das ganze brechbare Ende des Spektrums, die Absorption hört ziemlich scharf bei  $\lambda$  552 (D 56 E) auf (Garrod). In verdünnteren Lösungen erscheint ein von Mac Munn<sup>1)</sup> entdecktes doppelbandiges Spektrum. Von den beiden Streifen hat nach Zoja  $\alpha$  ungefähr die Lage  $\lambda$  550 —  $\lambda$  525,  $\beta$  die Lage  $\lambda$  510 — 484, nach Garrod kommt ihnen die Stellung  $\lambda$  546 —  $\lambda$  520 und  $\lambda$  506 —  $\lambda$  481 zu (D 70 E — E 13 F und E 44 F — F 9 G). Die Ränder sind stark verwaschen und die Grenzen deshalb nicht scharf zu bestimmen. Beide Bänder sind durch einen Schatten miteinander verbunden. Das rechte Band ist etwas dunkler als das linke. — Spektren der Verbindungen und der Zersetzungsprodukte bei diesen (5., 7., 8).

Bei einigermaßen konzentrierten Lösungen reicht die allgemeine Verdunkelung des violetten Endes des Spektrums bis zum rechten Rande von  $\beta$ . Der Streifen  $\beta$  fällt nahezu zusammen mit  $\gamma$  des Urobilins und  $\delta$  des alkalischen Hämatoporphyrins. Mit der Konzentration der Lösungen werden die Streifen zwar dunkler, jedoch nicht breiter (Riva), aber auch die dunkelste Stelle der Streifen ist nicht schwarz (Garrod), wie beim Urobilin. Andere Absorptionsstreifen rühren von fremden Farbstoffen her.

5. Verbindungen. Das Uratsediment enthält das Uroerythrin in chemischer Verbindung mit Harnsäure, was, wie Garrod zeigt, daraus hervorgeht, dass es ein anderes Spektrum besitzt als das freie oder das gelöste Uroerythrin. Es ist nur ein einziger, am rechten Rande verwaschener Absorptionsstreifen, und zwar bei  $\lambda$  589 —  $\lambda$  543 (D — D 70 E) vorhanden.

<sup>1)</sup> Mac Munn, Proceed. of the Roy. Soc. 35. 399. 1883.

Man sieht dieses Band im reflektierten Licht, sowie im durchfallenden, wenn man das auf geöltem Papier befindliche Sediment untersucht. Das Band ist weder an freiem, mit einem weissen Pulver gemischtem Uroerythrin im auffallenden, noch an dem auf eine Glastafel aufgetragenen Uroerythrin im durchfallenden Licht wahrnehmbar. — Die Lösung des Uratsedimentes in heissem Wasser bietet dagegen wie der Harn direkt das Spektrum des freien Farbstoffes dar (Riva, Zoja). Das mit Wasser gewaschene (ungelöste) Sediment gibt an absoluten Alkohol, an Amylalkohol, Äther, Chloroform kein Uroerythrin ab (Riva); mit einer Spur Säure versetzter, verdünnter Alkohol zieht aber Farbstoff aus (Zoja).

Die Ammonsalze (Chlorid, Sulfat), welche beim Sättigen des Harns mit denselben die Harnsäure fällen, schlagen auch vorhandenes Uroerythrin mit nieder. Wiewohl das Uroerythrin aus dem Harn durch Bleiacetat sowie durch Chlorbarium gefällt wird, so sind doch keineswegs alle Niederschläge, welche Uratlösungen mit Metallsalzen geben, als Verbindungen des Farbstoffes mit den Metallen anzusehen.

Riva und Zoja haben die Wahrnehmung gemacht, dass eine amyalkoholische Uroerythrinlösung beim Schütteln mit Lösungen von Calcium-, Barium-, Blei- oder Zinnsalzen in verschiedener Nuance rote und so lichtbeständige Niederschläge geben, wie die Uratsedimente. Diese Niederschläge sind jedoch, nach Garrod, keine Verbindungen des Metalls mit dem Farbstoff, sondern nichts anderes, als die Urate selbst. Der amyalkoholische Auszug aus dem Sediment oder dem Harn enthält etwas Harnsäure und diese wird dann auf Zusatz der genannten Salze zugleich mit dem Farbstoff gefällt. Versetzt man nach Garrod eine alkoholische Lösung nach seinem Verfahren dargestellten (harnsäurefreien) Uroerythrins mit Chlorbarium, so entsteht ein schwach gefärbter Niederschlag von Chlorbarium, der sich auf Zusatz von Wasser wieder vollständig löst; ein Tropfen einer farblosen Uratlösung gibt jetzt einen schönen roten Niederschlag.

Versetzt man eine Lösung von Uroerythrin in absolutem Alkohol mit wenig Tropfen einer gesättigten Bleiacetatlösung, so entsteht ein spärlicher, flockiger, in Wasser unlöslicher Niederschlag von dunkel rosenroter Farbe. Eine im Licht gebleichte ebensolche Lösung gibt bei der gleichen Behandlung einen farblosen Niederschlag.

6. Das Uroerythrin ist ausgezeichnet durch seine ausserordentlich geringe Lichtbeständigkeit; die Lösungen bleichen sehr schnell in zerstreutem oder chemisch aktivem Licht und werden, wenn der Farbstoff rein ist, ganz farblos. Mit der Farbe verschwindet auch das Spektrum. Im Dunkeln oder im chemisch indifferenten Licht behalten die Lösungen ihre Farbe selbst einige Tage lang (Riva). Im trockenen Zustand und in seiner Verbindung mit Harnsäure ist das Uroerythrin viel haltbarer.

In den gebleichten Lösungen lässt sich die Färbung nach Zoja weder durch Reduktions-, noch durch Oxydationsmittel wieder herstellen. — In urobilinhaltigen Lösungen ist das Band  $\beta$  dunkler, als in reinen, und verschwindet  $\alpha$  im Lichte, während ein Streifen von der Lage des Bandes  $\beta$ , Urobilin  $\gamma$ , übrig bleibt.

7. Das feste Uroerythrin wird durch Kalilauge sofort dunkelgrün und dann bald zerstört (Thudichum<sup>1)</sup>), und ebenso verhalten sich die roten Uratsedimente und Lösungen des Uroerythrins. Die grün gewordene amyalkoholische Lösung zeigt kein Absorptions-

<sup>1)</sup> Thudichum, Journ. of the chem. Soc. [2] 13. 399. 1875.

spektrum; im Lichte wird sie entfärbt, aber nicht so schnell, wie die ursprüngliche Lösung. Gegen Ammoniak ist es viel beständiger.

Wie die Kalilauge verhalten sich auch die Natronlauge und, nach Riva, alle alkalisch reagierenden Salze, mit Ausnahme des Ammoniaks. Eine mit Ammoniak versetzte Lösung behält in chemisch indifferentem Licht ihre rote Farbe viele Tage lang. Neutralisiert man die grüne Lösung, so wird sie nicht wieder rot. — Der schmutzig grüne Phosphatniederschlag, den man auf Zusatz von viel Lauge zu einem an Uroerythrin reichen Harn erhält, bewahrt seine Farbe stundenlang unter der Flüssigkeit.

Manchmal wird eine Uroerythrinlösung auf Zusatz von Lauge violett, dann indigblau, grün und darauf schnell farblos; die farbigen Lösungen zeigen Absorptionsstreifen. Riva, welcher diese Erscheinung zuerst beobachtet hat, vermutet, dass es sich um Varietäten des Farbstoffes handelt. Da aber in den früheren Stadien Ansäuern mit Essigsäure das ursprüngliche Spektrum wiederherstellt, so könnten nach Garrod auch Verbindungen des Farbstoffes mit Alkali vorliegen. Der Farbenwechsel dauert nur einen Teil einer Minute. In einem früheren Stadium ist ein Band bei  $\gamma$  672 —  $\gamma$  642,5 (auf C im äussersten Ende des Rot) zu sehen, die violette Lösung bietet zwei, denen des Indigos ähnliche Bänder dar. An der grünen Lösung ist das violette Ende des Spektrums verdunkelt.

Setzt man zu einer amylalkoholischen Lösung wenig Natronlauge, so scheidet sich nach Garrod zwar viel von dem grünen Produkt ab, der Alkohol behält aber doch noch eine rein grüne Färbung. Behandelt man den Abdampfungsrückstand des Alkohols mit Schwefelsäure oder Salzsäure, so erhält man eine carminrote Lösung, von denen die schwefelsaure ein Band bei  $\lambda$  582,5 —  $\lambda$  549 (D 10 E—D 63 E) aufweist, die salzsaure ein Band bei  $\lambda$  608 —  $\lambda$  549 (C 69 D bis D 63 E) aufweist. In beiden Fällen wird die Lösung beim Verdünnen mit Alkohol grün, auf Zusatz von viel Säure carminrot, und aus dieser Lösung nimmt Chloroform grünen Farbstoff auf.

8. Säuren erteilen einer Uroerythrinlösung eine andere Farbe und zerstören es zuletzt.

Die Farbenänderung tritt nach Garrod nicht immer auf, manchmal wird das Uroerythrin gleich zersetzt. Nach Heller löst es sich in konzentrierter Schwefelsäure mit dunkelroter Farbe; gegen konzentrierte Salzsäure verhält es sich ähnlich.

Nach Garrod wird eine Uroerythrinlösung durch konzentrierte Schwefelsäure prachtvoll carminrot, Chloroform nimmt viel von diesem Farbstoff auf und die Lösung zeigt dann ein dunkles Band bei  $\lambda$  586 —  $\lambda$  552 (C 95 D—D 58 E), ähnlich dem des Sediments, und manchmal noch ein zweites, schwächeres in Grün. Beim Verdünnen dieser Lösung mit Alkohol tritt die ursprüngliche Farbe und das ursprüngliche Spektrum wieder auf. — Salzsäure macht eine Lösung des Uroerythrins rosenrot, die konzentrierte Lösung zeigt ein schlecht begrenztes Band ungefähr bei  $\lambda$  608 —  $\lambda$  517 (C 62 D—E 23 F). Der rote Farbstoff wird von Chloroform aufgenommen, der Abdampfungsrückstand löst sich in Alkohol mit Farbe und Spektrum der ursprünglichen Substanz. — Phosphorsäure färbt Uroerythrinlösung lachsrot, Chloroform nimmt den Farbstoff auf; beim Verdünnen treten Farbe und Spektrum des Uroerythrins auf, aber das Spektrum ist sehr deutlich nach Rot verschoben und das blaue Ende des Spektrums viel weniger dunkel. — Die Lösungen werden grün und zuletzt farblos, die Reaktionen gelingen nicht immer.

Die Säuren zersetzen das Uroerythrin verschieden leicht, Schwefelsäure und Salzsäure leichter als Phosphorsäure (Garrod), Essigsäure schlechter als eine Mineralsäure, Weinsäure und Zitronensäure langsamer als Essigsäure; bei Gegenwart der organischen Säuren bleibt eine Uroerythrinlösung in chemisch



inaktivem Licht oder im Dunklen selbst tagelang unverändert (Riva). Gewöhnliches Licht beschleunigt die Zersetzung.

9 In ätherischer Lösung zersetzt sich das Uroerythrin leicht (Riva). Verdunstet man eine Chloroformlösung auf dem Wasserbade, so löst sich der Rückstand kaum, wenn überhaupt, wieder in Alkohol; beim Verdunsten des Chloroforms in gelinderer Wärme wird jedoch das Uroerythrin unverändert wieder gewonnen.

10. Durch Oxydations- und Reduktionsmittel wird das Uroerythrin nach Garrod entfärbt, auch im Dunklen.

Salpetersäure entfärbt fast augenblicklich, Wasserstoffsuperoxyd langsamer, schnell aber in Wasserbadwärme. Von den Reduktionsmitteln wirkt Zink und Salzsäure am schnellsten.

11. Ein Chromogen des Uroerythrins kommt im Harn nicht vor (Zoja). — Die von Mester<sup>1)</sup> ausgesprochene Vermutung, dass das Uroerythrin ein Skatolfarbstoff sein könne, findet in den seither näher bekannt gewordenen Eigenschaften des Uroerythrins keine Stütze.

C. Darstellung. Bei der Darstellung geht man am besten von dem roten Uratsediment aus, das sich aus stark abgekühltem Harn in grösseren Mengen absetzt, als bei gewöhnlicher Temperatur. Von den beiden in Verwendung gekommenen Verfahrungsweisen, der von Garrod und der von Zoja und Riva, liefert die von Garrod das reinere Präparat.

I. Nach Garrod. a) Das Sediment von mehreren Tagen wird auf einem Filter gesammelt, noch feucht vom Filter abgespritzt, dann, wenn nötig, noch unter Zusatz von Wasser in gelinder Wärme gelöst und die Lösung mit Chlorammonium gesättigt. Es schlägt sich alles Uroerythrin in Verbindung mit dem ausfallenden Ammonurat nieder. Der flockige Niederschlag wird abfiltriert, mit gesättigter Salmiaklösung vom Filter abgespült, wieder abfiltriert und das Verfahren so oft wiederholt, bis das Filtrat nicht mehr (von Urobilin) gelb gefärbt ist. Das Sediment besitzt jetzt eine reinere rosenrote Färbung als vorher, zeigt aber noch ein, der Verbindung von Hämatoporphyrin mit Metall angehöriges Absorptionsband bei D. Man lässt das Filter mit dem Niederschlag mehrere Stunden im Dunklen in warmem Alkohol liegen, wobei der Niederschlag leichter als das Sediment Uroerythrin an den Alkohol abgibt. Man filtriert, verdünnt den Alkohol mindestens mit dem doppelten Volumen Wasser und wäscht zur Entfernung der letzten Reste Hämatoporphyrin die Lösung so oft mit Chloroform, bis dieses sich nicht mehr färbt; ist die Lösung verdünnt genug, so nimmt dieses kein Uroerythrin auf. Setzt man jetzt einige Tropfen Essigsäure zu, so entzieht das Chloroform der Lösung das Uroerythrin schnell und vollständig. Das

<sup>1)</sup> R. Mester, Zeitschr. f. physiol. Ch. 12. 143. 1888.



Chloroform wird dann mit Wasser gewaschen und im Dunklen in gelinder Wärme (B. 9.) verdunstet; der Rückstand löst sich dann leicht in Alkohol. Das schnelle Verbleichen des Uroerythrins im Licht bietet ein Mittel, den Farbstoff auf seine Reinheit zu prüfen; die Lösung soll dann ganz farblos sein.

Es darf kein Sediment verwendet werden, das sich nach dem Gebrauch von Rheum oder Senna abgeschieden hat. — Um die Menge des Sedimentes zu vermehren, darf man dem Harn keine Essigsäure zusetzen, weil sich sonst das Uroerythrin beim Sättigen mit Salmiak nicht mit, sondern neben dem Ammonurat niederschlägt. — Beim Auflösen des Sediments darf man gerade nur so weit erwärmen, dass Lösung erfolgt, weil sich sonst das Uroerythrin nur schlecht in Alkohol löst. — 100 Teile Wasser lösen bei 10° 33, bei 20° 37 Teile Salmiak. — Beim Waschen der neutralen Flüssigkeit geht manchmal schon Uroerythrin in Lösung; meist ist eine zu geringe Verdünnung mit Wasser daran schuld.

b) Zur Darstellung lässt sich auch an Uroerythrin reicher Harn, aus dem sich kein Sediment abgesetzt hat, verwenden. Der Harn wird mit Salmiak gesättigt und mit dem Niederschlage verfahren, wie oben angegeben; aber das Produkt ist minder rein und namentlich mit Hämatoporphyrin verunreinigt. Bei der spontanen Abscheidung von Uratsedimenten bleibt das Hämatoporphyrin im Harn gelöst.

II. Zoja und Riva waschen das Uratsediment auf dem Filter mit eiskaltem Wasser, was sehr schlecht ausführbar ist, weil das Sediment schleimig aufquillt und das Filter bald ganz verstopft. Darauf befreien sie das Sediment vom fremden Farbstoff dadurch, dass sie es wenigstens unter Äthylalkohol einige Zeit liegen lassen. Nach Riva soll man es in derselben Weise auch mit Äther und Chloroform waschen. Es wird dann in warmem Wasser gelöst und die Lösung mit Amylalkohol geschüttelt (der durch fraktionierte Destillation gereinigt ist). Der Amylalkohol nimmt das Uroerythrin auf, und aus der wässrigen Lösung kann sich beim Erkalten farblose oder doch fast farblose Harnsäure krystallinisch abscheiden. Der Amylalkohol bildet mit der wässrigen Lösung eine Emulsion, aus welcher sich der Alkohol nur sehr langsam absetzt; eine Trennung beider Flüssigkeiten kann man aber nach Huppert's Erfahrung leicht bewerkstelligen, wenn man die Emulsion mit dem unvermeidlichen Teil wässriger Lösung auf ein mit Amylalkohol benetztes Filter bringt; im Filtrat sammelt sich der Alkohol auf der wässrigen Lösung als völlig klare Schicht an. Der Amylalkohol wird dann im Dunklen oder in chemisch indifferentem Licht verdunstet. Das Präparat ist nicht rein, sondern, wie Garrod (B. 5.) gezeigt hat, noch mit Urat verunreinigt.

D. Nachweis. Im Uratsediment macht sich das Uroerythrin meist schon durch seine rote Farbe kenntlich. Färbt es sich in zweifelhaften Fällen auf Zusatz von Lauge nicht schmutzig grün, so kann man es nach C. II. behandeln.

Wenn das Sediment vor dem Auflösen in Wasser durch Behandeln mit Alkohol genügend gereinigt war, so wird sich das Uroerythrin in dem amyalkoholischen Auszug ohne besondere Schwierigkeit an seiner Farbe, seinem Spektrum und dem schnellen Verbleichen im Licht erkennen lassen.

Wichtiger ist der Nachweis des Uroerythrins im Harn selbst. An dem Farbstoff reicher Harn zeigt vor der Abscheidung eines Sediments eine eigentümliche matt orangerote Färbung, die man leicht wieder erkennt, wenn man sie einmal gesehen hat. Zum sicheren Nachweis des Uroerythrins dient das Spektrum des Harns und die Extraktion des Harns mit Amylalkohol.

Wenn der Harn reich an Uroerythrin ist, so kann er nach Riva in dicker Schicht das Spektrum des freien Uroerythrins darbieten. Von ausschlaggebender Bedeutung ist aber nur der Streifen  $\alpha$ , oder ein Schatten an seiner Stelle, da ein Streifen in der Lage von  $\beta$  auch von Urobilin oder Hämatoporphyrin herrühren kann. Für diese Untersuchung genügt eine Schicht in der Dicke von 10–12 cm. Ein negativer Ausfall der Beobachtung beweist jedoch die Abwesenheit des Farbstoffes nicht.

Um das Uroerythrin aus dem Harn in Amylalkohol überzuführen, soll man nach Riva 300–500 ccm Harn mit 50–60 ccm Alkohol schütteln (C. II.), von Harnen, die reich an Uroerythrin sind, genügt auch eine geringere Menge. Saurer Harn lässt sich besser extrahieren als neutraler; ein Ansäuern des Harns mit Essigsäure ist trotzdem zu vermeiden, weil das Uroerythrin zerstört wird und auch eine grössere Menge Urobilin in Lösung geht. Man filtriert die Gallerte durch ein mit Amylalkohol benetztes Filter oder klärt durch wenig Äthylalkohol. Der Amylalkohol enthält nicht bloss das Uroerythrin, sondern auch Urobilin und Hämatoporphyrin, welche auf die Farbe, das Spektrum und die Lichtbeständigkeit der Lösung von Einfluss sind. Eine reine Orangefarbe macht die Gegenwart des Uroerythrins schon sehr wahrscheinlich. Bei der spektroskopischen Untersuchung ist daher auch nicht der Hauptwert auf die Gegenwart des ganzen Uroerythrinspektrums zu legen, sondern nur auf den Streifen  $\alpha$ , da ein Band von der Lage des Streifens  $\beta$  vom Urobilin und Hämatoporphyrin herrühren kann. Ist  $\alpha$  sichtbar und verschwindet dieses Band bei der Belichtung, so ist die Gegenwart des Uroerythrins erwiesen. Mit dem Verschwinden des Streifens  $\alpha$  wird die Lösung blasser, braucht sich aber, wegen der Gegenwart der anderen Farbstoffe, nicht völlig zu entfärben. Eine Abscheidung des Uroerythrins durch Zusatz eines Erdalkali- oder Metallsalzes empfiehlt sich nicht, weil dabei auch das Hämatoporphyrin ausfällt.

Von anderen Mitteln ist noch die Abscheidung der Harnsäure durch Sättigen des Harns mit Chlorammon (C. I.) passend. Der Umstand, dass Harn mit viel Uroerythrin auf reichlichen Zusatz von Lauge einen schmutzig grünen Phosphatniederschlag gibt, eignet sich nicht zum Nachweis geringer Mengen des Farbstoffs.

#### Urohämatin von Harley.

Harley stellte aus Harn einen eisenhaltigen roten Körper dar, den er Urohämatin nannte. Normaler Harn wird unter fortwährender Entfernung der sich ausscheidenden Salze zum Sirup eingedunstet, der Rückstand mit Alkohol ausgezogen und die alkoholische Lösung bis zur Entfärbung mit Kalkmilch gekocht, wobei ein roter Niederschlag entsteht. Dieser wird mit Wasser und mit Alkohol gewaschen, mit Salzsäure zerlegt und mit Alkohol ausgezogen. Die alkoholische Lösung wird darauf mit dem gleichen Volumen Äther tüchtig geschüttelt, der Äther abgehoben, mit Wasser gewaschen und verdunstet; dabei bleibt eine dunkelrote Substanz zurück, die sich in Alkohol und in Äther mit roter Farbe löst und beim Verbrennen einen voluminösen Rückstand von Eisenoxyd lässt. Eine dieser ähnliche Substanz wurde auch aus den von Scherer<sup>1)</sup> aus Harn dargestellten Farbstoffen gewonnen.

Das Urohämatin löst sich nicht in Wasser oder in Neutralsalzlösungen, auch nicht in Säuren, aber in Alkohol, Äther, Chloroform und in ätzenden Alkalien.

#### Giacosa's Farbstoff.

Giacosa<sup>2)</sup> hält den von ihm dargestellten Farbstoff für wenigstens verwandt mit dem Urohämatin von Harley. Er entsteht wie das Uromelanin von

<sup>1)</sup> G. Harley, Verhandl. d. physik.-med. Gesellsch. zu Würzburg 5. 1. 1854. — Scherer, Ann. d. Ch. u. Pharm. 57. 180.

<sup>2)</sup> P. Giacosa, Ann. di chim. e di farmac. [4] 3. 201; Ber. d. chem. Gesellsch. 20. Ref. 393. 1887; Jahresber. f. Tierch. 1886. 213.

Plósz, das Urorubin (Urrhodin), das Urorosein etc. durch Einwirkung von Säuren auf Harn. Von dem Uromelanin unterscheidet er sich durch seine Löslichkeitsverhältnisse, von dem Urorubin und dem Urorosein u. a. durch den Mangel von Absorptionsstreifen. Möglich ist es, dass der Amylalkohol bei seiner Bildung beteiligt ist (s. Uromelanin von Plósz).

Das Chromogen des Farbstoffes tritt regelmässig bei Mensch, Hund und Kaninchen im Harn auf; es kann durch Amylalkohol ausgeschüttelt und durch Bleiessig grösstenteils gefällt werden.

Der Farbstoff wird erhalten, wenn man den Harn mit Bleizucker ausfällt, das überschüssige Blei mit Schwefelwasserstoff, diesen durch Erwärmen entfernt und den Harn nach dem Erkalten mit 0,8 Volumen Salzsäure von 1,19 Dichte versetzt. Ist die Flüssigkeit in einigen Minuten rosenrot geworden, so wird sie mit dem gleichen Volumen Amylalkohol ausgeschüttelt, nach spätestens einer Stunde der rubinrote Amylalkohol abgehoben, mit Wasser säurefrei gewaschen, was nach v. Udránszky<sup>1)</sup> jedoch nicht vollständig gelingt, der Amylalkohol abdestilliert, der Rückstand mit warmem Wasser und zur Entfernung etwa vorhandenen Urobilins mit verdünntem Ammoniak gewaschen. Nach dem Trocknen wird der Farbstoff in wasser- und alkoholfreiem Äther gelöst, die Lösung verdunstet, der Rückstand mit Wasser und Ammoniak gewaschen, wieder in Äther gelöst und das Verfahren so oft als nötig wiederholt. Der in Äther unlösliche Teil löst sich in Alkohol und ist spektroskopisch von dem in Äther löslichen nicht zu unterscheiden.

Bei der Darstellung lässt sich weder die Salzsäure noch der Amylalkohol durch eine andere Substanz ersetzen. Lässt man den Amylalkohol länger als 1 Stunde über dem angesäuerten Harn stehen, so geht auch sich bildender brauner Farbstoff in den Alkohol über.

Der Farbstoff bildet eine braune, feste Masse, welche bei 100—120° schmilzt und über Schwefelsäure scheinbar krystallisiert. Seine Lösungen in Äther, in Alkohol und in Amylalkohol zeigen keinen Absorptionsstreifen. Die Lösungen in Äther und in Chloroform besitzen eine schön grüne Fluorescenz, die amyloalkoholischen fluorescieren nur schwach, die alkoholischen gar nicht. Der Farbstoff enthielt 0,45% Asche, die fast nur aus Eisen bestand. Beim Kochen mit Salzsäure wird der Farbstoff zerstört.

### Der Harnsäurefarbstoff von Kunkel.

Wie die beiden soeben beschriebenen Farbstoffe ist auch der Farbstoff, welcher der mit Salzsäure aus normalem Harn gefällten Harnsäure ihre braune Farbe erteilt, nach Kunkel<sup>2)</sup> eisenhaltig. Versetzt man den mit Salzsäure ausgefällten Harn mit einer Lösung von harnsaurem Natron, so fällt wieder durch den eisenhaltigen Farbstoff gefärbte Harnsäure aus. Der isolierte Farbstoff besitzt keine ausgezeichneten spektroskopischen Eigenschaften.

Wie Kunkel, fand auch Garrod<sup>3)</sup> die mit Salzsäure gefällte wie die von selbst ausgefallene Harnsäure in geringem Grade, die von selbst ausgefallene aber stärker eisenhaltig, als die mit Säure gefällte. Da dieser Farbstoff nur einen kleinen Teil der in der Harnsäure enthaltenen Farbstoffe ausmacht, so müsste er reich an Eisen sein. Für das Bestehen eines eisenhaltigen Farbstoffes spricht aber nur diese Tatsache.

### Der von Leube beobachtete Farbstoff.

Aus dem pathologischen Harn, welcher an der Luft tiefdunkelviolet wurde, ging der Farbstoff nach Leube<sup>4)</sup> mit schön dunkelvioletter Farbe in Äther über.

<sup>1)</sup> v. Udránszky, Zeitschr. f. physiol. Ch. 11. 548. 1887.

<sup>2)</sup> Kunkel, Sitzungsber. d. physik.-med. Gesellsch. zu Würzburg 1881. 69; Jahresber. f. Tierch. 21. 246.

<sup>3)</sup> Archibald E. Garrod, Journ. of Pathol. and Bacteriol., November 1894. 104.

<sup>4)</sup> W. Leube, Virchows Archiv 106. 418. 1886.



Beim Verdunsten des Äthers blieb der Farbstoff in schwarzen, harzigen Flocken zurück. Heisses Wasser löste den Rückstand zum grossen Teil; in Äther, Benzol, Chloroform, Alkohol löste er sich mit der ursprünglichen Farbe; die Lösungen zeigten keine Fluorescenz. Nach der weiteren Untersuchung von E. Fischer wurde der Farbstoff in der ätherischen Lösung durch verdünnte Säuren nicht verändert, auch nicht dem Lösungsmittel entzogen. Verdünntes Alkali nahm ihn dagegen auf. Die Lösung war anfangs braunrot, wurde aber bei einigem Stehen gelb. Konzentrierte Schwefelsäure zerstörte den Farbstoff sofort; kalte konzentrierte Salzsäure löste ihn anscheinend ohne Veränderung, beim Erhitzen entfärbte sich aber die Lösung. Die alkoholische Lösung wurde durch Zinkstaub entfärbt und an der Luft wieder violett; dasselbe war der Fall, wenn die mit Zinkstaub versetzte alkoholische Lösung mit Essigsäure schwach angesäuert wurde. Vor dem Spektroskop zeigte auch die konzentrierte ätherische Lösung nur eine ganz schwache, diffuse Auslöschung von E bis gegen G. — Durch seine Löslichkeit in Alkali und sein spektroskopisches Verhalten unterscheidet sich der Farbstoff von Indigrot.

### Der von Thormählen beobachtete Farbstoff. ¶

Der von Thormählen<sup>1)</sup> untersuchte Harn stammte von einer an Leber- und Milztumor leidenden Frau. Er war bei saurer Reaktion dunkelbraun und setzte ein rosenrotes Uratsediment ab. Bei der Jafféschen Indicanprobe trat eine intensiv dunkelrote Färbung auf. Verdünnte Eisenchloridlösung färbte den Harn schwach rot. Bei der Legalschen Acetonreaktion (S. 243) wurde die Probe nach dem Ansäuern mit Essigsäure sofort prachtvoll blau. Diese Reaktion wurde noch an vier anderen Menschenharnen bemerkt, von denen drei reich an Indican waren.

Pferde- und Katzenharn geben nach Thormählen bei der Legalschen Probe gleichfalls eine Blaufärbung, wenn auch nur schwach. Die Substanz, von welcher sie herrührt, ist nicht flüchtig, wird durch starke Mineralsäuren bald, durch organische langsamer zersetzt, dagegen nicht durch Alkalien, selbst nicht in der Siedehitze. Eisenchlorid sowie Bleizucker fällen sie nicht, wohl aber Bleiessig zum Teil und Bleisalz und Ammoniak fast vollständig. Aus dem Bleiniederschlag erhält man sie nicht durch Schwefelwasserstoff, aber durch kohlensaures Natron wieder. Tierkohle hält sie zurück. Aus dem Abdampfungsrückstand des Pferdeharns lässt sie sich durch siedenden Alkohol ausziehen; ein gleiches Volumen Äther fällt sie ziemlich vollständig aus der alkoholischen Lösung. Auch in Amylalkohol und Glycerin ist sie löslich, dagegen nicht in Chloroform, Petroläther, Benzol und Schwefelkohlenstoff; in heissem Äther und Essigäther löst sie sich nur wenig. Unter der Voraussetzung, dass es sich um eine Ätherschwefelsäure handelte, wurde noch versucht, das Kalisalz derselben nach Baumann und Brieger (S. 804) darzustellen und dabei wurde ein an Indican und der fraglichen Substanz reiches Produkt erhalten.

### Der von Schölberg beobachtete Farbstoff. ¶

Schölberg<sup>2)</sup> fand im Harn eines an peripherer Neuritis Leidenden einen roten Farbstoff, der in den gewöhnlichen Lösungsmitteln schwer löslich war und spektroskopisch einen Streifen zwischen Blau und Grün aufwies. Bei dem Vater und der Schwester des Patienten fand sich dasselbe Pigment im Harn.

<sup>1)</sup> Joh. Thormählen, Virchows Archiv 108. 313. 1887.

<sup>2)</sup> Schölberg, Transact. of the pathol. soc. London 1902 July, zit. n. Jahresb. f. Tierch. 33. 951.



### Nephrorosein.

Im Harn von Scharlachrekonvaläszenten hat Arnold<sup>1)</sup> meist neben Urorosein einen diesem sehr ähnlichen Farbstoff beobachtet, der sich vom Urorosein durch sein spektroskopisches Verhalten unterscheidet.

Der Nephrorosein genannte Farbstoff zeigt ein ziemlich scharf begrenztes Absorptionsband zwischen b und F ( $\lambda$  517— $\lambda$  500). Die stärkste Absorption entspricht dem nach F gelegenen Rand des Spektrums.

Eine reine Lösung des Farbstoffes ist mattrot, in konzentrierter Lösung nähert sie sich dem Ziegelrot. Um den Farbstoff zu erhalten, versetzt man den Harn mit konzentrierter Salzsäure unter Vermeidung eines Überschusses; weniger zweckmässig mit  $\frac{1}{3}$  Vol. Salzsäure vom spezifischen Gewicht 1,19 und einem Tropfen 1%iger Natriumnitritlösung. Das Absorptionsband ist meist schon bei Untersuchung des so behandelten Harns am Spektralapparat sichtbar, bei zweifelhaftem oder negativem Ergebnis ist der amyalkoholische Auszug zu prüfen.

Das Verhalten gegenüber organischen Lösungsmitteln, Alkalien und Säuren ist das gleiche wie das des Uroroseins.

Im normalen Harn fand Arnold Nephrorosein nie, bei Scharlachrekonvaläszenten vom Ende der zweiten oder von der dritten Woche an fast regelmässig längere Zeit hindurch. Bei Eintritt von Nephritis in dieser Periode verschwand es bei schwerem Verlauf der Erkrankung ebenso wie das Urorosein und Urobilin. Mehrfach wurde Nephrorosein auch nach anderen Infektionskrankheiten (Masern, Flecktyphus), bei chronisch verlaufender Tuberkulose, bei orthostatischer Albuminurie, bei Nephritiden und bei Typhusrekonvaläszenten nach Darreichung von Salicylaten beobachtet.

---

### Anhang.

Farbstoffe, die bei Gegenwart von Formaldehyd auftreten.

Nach de Jager<sup>2)</sup> wird normaler Harn auf Zusatz von Formalin und Salzsäure rot. Der entstandene rote Farbstoff wird von dem ausfallenden Formaldehyd-Harnstoff mit niedergerissen. In saurem Alkohol gelöst zeigt der Farbstoff einen Absorptionsstreifen zwischen C bis F.

<sup>1)</sup> V. Arnold, Zeitschr. f. physiol. Ch. **61**, 240. 1909.

<sup>2)</sup> L. de Jager, Ztschr. f. physiol. Chem. **64**, 110. 1910.

Er ist in konzentrierten Mineralsäuren löslich und fällt beim Verdünnen aus. Konzentrierte Schwefelsäure zerstört ihn, mit Salpetersäure wird er gelb. Mit Alkalien färbt er sich orangegelb bis braun. Die Muttersubstanz ist in der nach Garrod bereiteten Urochromlösung (s. dieses) vorhanden.

Im Harn von schweren Diabetikern beobachtete Stryzowski<sup>1)</sup> bei Zusatz von 5% Formalin nach 12—24 stündigem Stehen Bildung eines grünfluoreszierenden Farbstoffes. Zur Isolierung wurde der mit Bleiessig vorbehandelte Harn mit 5% Formalin 1—2 Tage stehen gelassen, dann mit Chloroform ausgeschüttelt, die blaufluoreszierende Lösung mit Ammoniakwasser gewaschen und das Pigment dem Chloroform mit verdünnter Salzsäure entzogen. Die salzsaure Lösung wurde mit Ammoniak alkalisch gemacht und wieder mit Chloroform ausgeschüttelt. Der rotgelbe Farbstoff, der aus dem Chloroform zurückbleibt, ist in Wasser und Alkohol löslich, in Petroläther und Schwefelkohlenstoff unlöslich. Die Lösung absorbiert das Spektrum bis gegen F. — Mineralsäuren sowie Oxydationsmittel heben die Fluoreszenz auf, Alkalien, nascierender Wasserstoff in alkalischer Lösung und Erhitzen der Lösung sind ohne Wirkung auf die Fluoreszenz.

Wie Gaupp<sup>2)</sup> nachgewiesen hat, entsteht der fluoreszierende Farbstoff, wenn Acetessigsäure, Ammoniak und Formaldehyd zusammen treten. Die Reaktion ist daher im Harn vieler Kachektischer, in dem diese Bedingung erfüllt ist, positiv.

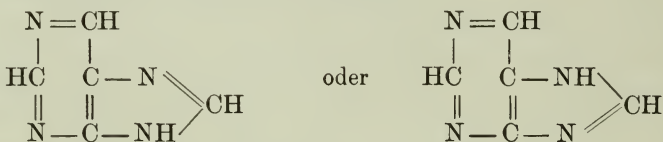
<sup>1)</sup> K. Stryzowski, *Pharmac. Post* **39**. 2. 1906, zit. n. Jahresber. f. Tierch. **36**. 320.

<sup>2)</sup> O. Gaupp, *Biochem. Zeitschr.* **13**. 138. 1908.

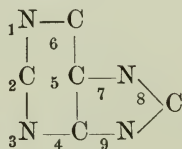
## Die Purinstoffe und das Allantoin.

Von W. Wiechowski-Prag.

Die Purinstoffe<sup>1)</sup>, deren Konstitutionsermittlung wir E. Fischer und seinen Schülern verdanken, sind Derivate des aus neun Gliedern ringförmig zusammengesetzten Purins (abgeleitet von purum uricum E. Fischer<sup>2)</sup>), welches einen Pyrimidinkern mit einem Imidazol-kern (Glyoxalinkern) kombiniert darstellt:

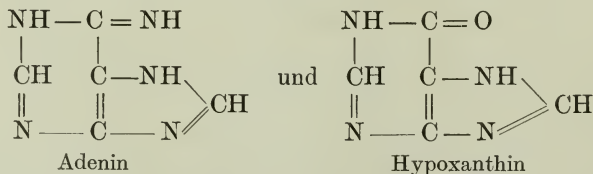


Sie werden nach dem Schema:



bezeichnet.

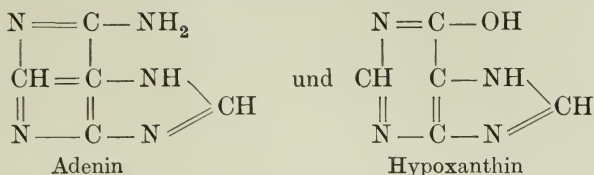
Die im Harn vorkommenden Purine sind Substitutionsprodukte des Purins mit Amino-, Sauerstoff- und Methylgruppen, wonach man Amino-, Oxy- und Methylpurine unterscheidet. Bei den Amino- und Oxypurinen sind zwei tautomere Formeln möglich. Insofern man sie nämlich als Derivate des gesättigten Purins auffasst, sind sie als Imino- und Keto(Laktam)verbindungen zu bezeichnen, z. B.



<sup>1)</sup> Die Purinstoffe des tierischen Organismus wurden früher, mit Ausnahme der Harnsäure, Nukleinbasen (Kossel), Alloxurbasen (Kossel und Krüger) oder Xanthinbasen, die ganze Gruppe samt der Harnsäure Alloxurkörper (Kossel und Krüger) genannt.

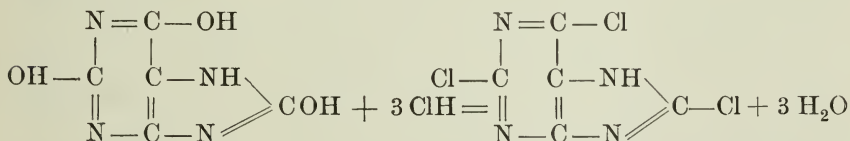
<sup>2)</sup> B. B. 17. 329. 1884; 31. 2550. 1898.

Fasst man sie aber als Derivate des ungesättigten Purins auf, so sind sie als Amino- und Enol(Laktim)verbindungen zu schreiben:



Man kann zwischen beiden Formeln meist nicht sicher entscheiden (bei vielen Reaktionen reagieren die Oxypurine als Enole). Da es aber zweckmässig ist, sich stets einer bestimmten Formel zu bedienen, so werden nach dem Vorschlage von E. Fischer<sup>1)</sup> die Oxypurine als Keto(Laktam)verbindungen und die Aminopurine als primäre Amine geschrieben. In jenen Purinstoffen, welche den Wasserstoff des Glyoxalinrings unsubstituiert enthalten, tritt ausserdem noch die dem Purin selbst zukommende Tautomerie auf, indem dieses Wasserstoffatom keine bestimmte Stelle einnimmt (s. oben), da beim Methylieren z. B. des angeführten Adenins ein Gemenge von zwei Methyladeninen erhalten wird (E. Fischer<sup>2)</sup>). Aus Gründen der Einheitlichkeit werden diese Purinstoffe nach E. Fischer mit der NH-Gruppe in Stellung 7 geschrieben.

Die Kenntnis der Konstitution des Purins und der Purinstoffe baut sich auf der Kenntnis von der Molekularstruktur der Harnsäure auf, da das Purin von E. Fischer aus der Harnsäure dargestellt wurde. Durch Phosphoroxychlorid werden die 3 O-Atome der Harnsäure durch Cl ersetzt, wobei die Harnsäure als Laktim (Enol) reagiert. In dem gebildeten Trichlorpurin, welches unter der Voraussetzung, dass die Konstitution der Harnsäure richtig erkannt ist, die folgende Formel haben muss:



werden durch stufenweise Reduktion die Cl- durch H-Atome ersetzt. Die vollständige Reduktion liefert das Purin, welchem daher die oben gegebene Formel zukommen muss.

Eine direkte Synthese des Purins ist übrigens nach dem Vorgange von S. Gabriel und J. Colman, welche als erste ein sauerstoffreies Purinderivat direkt synthetisiert haben, Oskar Isay gelungen. 5-Nitrouracil wird durch Phosphoroxychlorid in 2,4-Dichlor-5-Nitropyrimidin verwandelt, dieses gibt mit Ammoniak 4-Amino-2-chlor-5-nitropyrimidin, aus dem durch Behandeln mit Phosphoniumjodid und Jodwasserstoff das 4,5-Diaminopyrimidin gewonnen wird, das beim Kochen mit wasserfreier Ameisensäure in Purin übergeht (B.B. 39. 250. 1906).

<sup>1)</sup> B. B. 30. 556. 1897.

<sup>2)</sup> B. B. 30. 549. 2249. 1897.



Purin F. 216—217° bei raschem Weitererhitzen sublimierende weisse Nadelchen, sehr l. in W., A. swl. in Ae. Nitrat, F: 205° unter Zersetzung. Pikrat, gelbe glänzende Blättchen aus 21 T. sied. W. F. 108°. Weiter Chlor- und Jodhydrat, Sulfat. Pt-Au-Na-Ba-Ag-Salz in heissem Wasser schwer lösl. Zn-Salz,  $\text{HgCl}_2$ -Doppelsalz, kryst. Pulver. KJ, Nessler's Reagens, Ferrocyankalium, Ferrocyanwasserstoff fallen nicht. PWS fällt milchig, Tanninlösung fällt flockig, Jodwismutkalium einen roten körnigen Niederschlag, der ich in der Hitze löst. Brom fällt aus Purinlösung in rauchender Salzsäure einen schön krystallisierenden gelbroten Körper, der sich beim Erwärmen löst. Murexidreaktion ist negativ, gegen Oxydationsmittel ist das Purin relativ beständig (E. Fischer, B.B. 31. 2550. 1898). Die Reduktion des Trichlorpurins zu Purin geht folgendermassen: mit HJ entsteht Dijodpurin, welches über das Ammoniaksalz gereinigt wird, das Dijodpurin wird dann mit Zinkstaub unter Einleiten von  $\text{CO}_2$  zu Purin reduziert, wobei sich die Base völlig als unlösliches Zn-Salz abscheidet, dieses wird unter Erwärmen mit  $\text{H}_2\text{S}$  zerlegt und die Rohbase über das Nitrat gereinigt (E. Fischer, ebenda).

Die Purinstoffe sind lediglich in den Nucleinsäuren vorgebildet. Eiweiss enthält keine Purine (Kossel). Aus den Nucleinsäuren werden sie, wie oben besprochen, in Freiheit gesetzt und kommen dann in den betreffenden Organismen auch frei vor. Die Methylxanthine der Pflanzen kommen, so weit bekannt, nur frei vor.

## A. Allgemeine Übersicht.

I. Physiologisches Verhalten. Die Purinstoffe des Harns entstammen teils den Purinen der Nahrung (exogene Harnpurine), teils haben sie ihre Quelle im Organismus selbst (endogene Harnpurine)<sup>1</sup>).

Der im Organismus entstehende Teil verdankt seinen Ursprung entweder dem Abbau der körpereigenen Nucleinsäuren oder einer Synthese aus purinfreiem Material.

Nach Art der Entstehung der endogenen Harnpurine lassen die Wirbeltiere zwei scharf getrennte Gruppen unterscheiden.

Die eine Gruppe umfasst die auch sonst als zusammengehörig erkannten und als Sauropsiden vereinigten Klassen der Vögel und Reptilien. Bei ihnen wird die Hauptmasse des Harnstickstoffs in Purinform (Harnsäure) ausgeschieden, und die Zufuhr jeder beliebigen N-haltigen Nahrung steigert die Purinausscheidung, während der Harnstoff nur in geringer Menge auftritt, ja, wenn als solcher zugeführt, in Harnsäure umgewandelt wird (H. H. Meyer<sup>2</sup>). Hier verdankt also der grössere Teil der endogenen Harnpurine einer im Organismus vorsichgehenden Synthese seinen Ursprung und nur ein wesentlich kleinerer zweiter Teil kommt von den im Stoffwechsel durch Abbau der Körperbestände frei werdenden Purinen her.

Der zweiten Gruppe der Wirbeltiere gehören die Säugetiere und wahrscheinlich auch die Fische und Amphibien an. Sie entleeren flüssigen Harn. Bei ihnen tritt die Harnpurinausscheidung gegenüber der Harnstoffausscheidung zurück. Die Hauptmenge des Harnstick-

<sup>1</sup>) R. Burian und H. Schur, Pflügers Arch. 80. 241; V. O. Siven, Sk. Arch. f. Phys. 11. 123. 1900.

<sup>2</sup>) Hans Meyer, Beiträge zur Kenntnis des Stoffwechsels im Organismus des Huhnes. Inaug.-Dissert. Königsberg 1877.

stoffs wird als Harnstoff ausgeschieden und jede beliebige einer Grundkost hinzugefügte N-haltige Nahrung steigert die Harnstoffausscheidung, soweit nicht Ansatz erfolgt. Aber nur die Zulage bestimmter Nahrungsstoffe steigert auch die Purinausscheidung, während die Zulage anderer Nahrungsstoffe keinen Einfluss auf die Menge der ausgeschiedenen Purine zeigt.

Nach Zulage von 24 Eiern zu einer konstanten Kost trat beim Menschen keine Vermehrung der Harnpurine ein (an der Harnsäureausscheidung gemessen)<sup>1)</sup>. Dagegen steigt nach Fleischzulage der Harnpurinwert bedeutend und mit der Grösse der Zulage in steigendem Masse an<sup>2)</sup>. Andererseits sinkt die Harnpurinausscheidung, wenn man von gemischter Kost zu fleischloser oder N-freier übergeht<sup>3)</sup>. Es besteht kein Parallelismus zwischen Gesamt-N(Harnstoff)- und Purinausscheidung (Harnsäureausscheidung beim Menschen)<sup>4)</sup>. Es hat sich nun herausgestellt, dass alle Nahrungsstoffe oder Substanzen, welche die Harnpurinausscheidung der Säugetiere erhöhen, freie oder gebundene Purine enthalten. Diese sind es allein, wie beim Fleisch, welche die Vermehrung der Harnpurine bedingen<sup>5)</sup>. Die Harnpurine des Säugetieres entstehen also entgegen einer früher allgemeinen Annahme nicht aus Eiweiss, sondern, soweit sie nicht präformiert eingeführt werden, lediglich aus den im Stoffwechsel zerfallenden Nucleinsäuren der Zellen, also durch Abbau und nicht durch Synthese. Der Purinhaushalt der Säugetiere lässt sich demnach nur bei purinfreier Ernährung bzw. unter genauer Berücksichtigung des Puringehaltes der Nahrung studieren. Alle die zahlreichen Untersuchungen, die ohne Berücksichtigung der Qualität der Nahrung ausgeführt worden sind, haben heute ihren Wert verloren. Schon aus dem bisher Gesagten geht hervor, dass der Purinstoffwechsel der Säuger ein selbständiger, autonomer Teil des Gesamt-N-Stoffwechsels ist und dass daher die auch heute noch manchmal aufgestellte Beziehung Purin-N zu Gesamt-N gar keine Aufschlüsse geben kann, solange man nicht Mittel hat, auch den endogenen N-Wechsel bei sonst ausreichender Ernährung zu bestimmen.

Allerdings muss auch bei den Säugetieren eine synthetische Bildung von Purinstoffen im Stoffwechsel angenommen werden, da sich im Organismus Nucleoproteide aus purinfreiem Material bilden. Bei der

<sup>1)</sup> Hess und Schmoll, Arch. f. exp. Path. u. Pharm. **37**. 243. 1896.

<sup>2)</sup> Mareš, Arch. slaves de Biol. **3**. 207. 1887; Sbornik lekarsky **2**. 1. 1888. — Hopkins und Hope, Journ. of phys. **23**. 271. 1898. — P. Pfeil, Zeitschr. f. phys. Chem. **40**. 1. 1903.

<sup>3)</sup> Pfeil, l. c.

<sup>4)</sup> Mareš, l. c., Salkowski, Virch. Arch. **117**. 570. 1889; Zeitschr. f. d. med. Wissensch. 1890. 360. — Schreiber und Waldvogel, Arch. f. exp. Path. u. Pharm. **42**. 69. 1899

<sup>5)</sup> Burian und Schur, l. c., Siven, l. c. Weintraut, Berl. klin. Wochenschr. 1895. 405. — J. Strauss, ebenda, 1896. 710. — Smith Jerome, Journ. of phys. **22**. 146. 1898. — K. Rzentkowski, nach Malys J. T. **30**. 760.

Ernährung des neugeborenen Säugetieres mit der purinfreien Muttermilch nimmt sein Purinstoffgehalt mit dem Wachstum zu<sup>1)</sup> und trotz vollkommen purinfreier Ernährung des Erwachsenen ist die Erhaltung des Körperbestandes bei dauernder Purinausscheidung gewährleistet. Aber diese synthetische Bildung kann nicht die zur Ausscheidung gelangenden Purine betreffen — dagegen spricht die individuelle Konstanz des endogenen Purinwertes bei verschiedener Ernährung (siehe weiter unten) —, sondern kann sich nur auf die neugebildeten Nucleoproteide (oder Nucleinsäuren) beziehen. Diese postulierte Synthese hat jedenfalls nichts zu tun mit den verschiedenen Versuchen, die Synthese einzelner Purinstoffe im Organismus zu beweisen, welche alle als gescheitert gelten können<sup>2)</sup>.

Im Harn sind folgende Purine gefunden worden:

Basen:

6-Aminopurin (Adenin), 2-Amino-6-Oxypurin (Guanin) und sein 7-Methylderivat (Epiguanin), 6-Oxypurin (Hypoxanthin, Sarkin), 2-6-Dioxyypurin (Xanthin) und seine Methyl-derivate: 1-Methylxanthin, 1-7-Dimethylxanthin (Paraxanthin), 7-Methylxanthin (Heteroxanthin).

Harnsäure (2-6-8-Trioxypurin)

und unter besonderen Bedingungen: 3-Methylxanthin, 1-3-Dimethylxanthin, 3-7-Dimethylxanthin (Theobromin), 1-3-7-Trimethylxanthin (Kaffein), 7-Methyl-8-Dimethylaminoxanthin und 6-Amino-2-8-Dioxyypurin.

Die nähere biologische und chemische Beziehung dieser Stoffe zueinander erscheint durch die Art der Seitenketten bedingt.

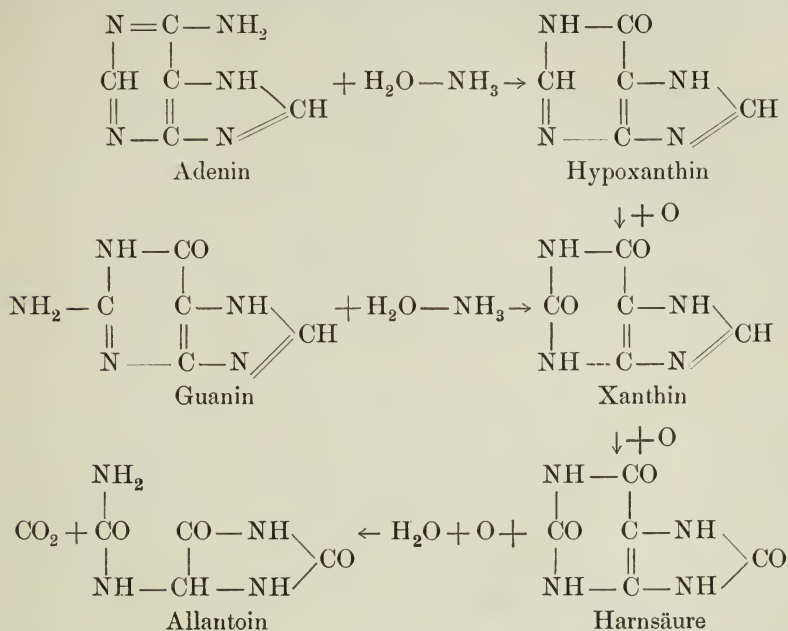
Bei den natürlich vorkommenden Amino- und Oxypurinen stehen die Seitenketten in den Stellungen 2, 6, 8. Bei den natürlich vorkommenden Methylpurinen stehen die Methylreste in den Stellungen 1, 3, 7. Die Methylpurine (Methyl-derivate des Xanthins) bilden eine biologische Gruppe für sich. Sie kommen, soweit bekannt ist, primär nur im Pflanzenreiche vor. Ihr Auftreten im Harn hängt von ihrer Aufnahme mit der Nahrung ab, und sie haben zu den Purinen der Nucleinsäuren und ihren Umwandlungsprodukten (Harnsäure, Allantoin) nur eine sehr lockere Beziehung. Die Amino- und Oxypurine ihrerseits bilden ebenfalls eine Gruppe für sich. Die Aminopurine sind in den tierischen und pflanzlichen Nucleinsäuren vorgebildet (siehe dort). Sie gehen durch Desaminierung im Organismus in die Oxypurine Hypoxanthin und Xanthin und durch Oxydation weiter in Harnsäure über. Schliesslich

<sup>1)</sup> R. Burian, Zeitschr. f. phys. Ch. **23**. 55. 1897.

<sup>2)</sup> Synthese von Harnsäure aus Harnstoff und dreigliedrigen Kohlenstoffketten. H. Wiener, Hofmeisters Beitr. zur ch. Phys. und Path. **2**. 42. — R. Burian, Zeitschr. f. phys. Ch. **43**. 479. 1905. — W. Pfeifer, Hofmeisters Beitr. **10**. 324. 1907. — Harnsäure aus Dialursäure: Ascoli und Mitarbeiter (s. Harnsäure), Harnsäure aus Cholesterin und Ammoniak, Moska und Apolloni (s. bei Harnsäure), aus Pyrimidin, Kossel und Steudel, von Basen aus Harnsäure, Kutscher und Seemann, Zeitschr. f. phys. Ch. **17**. 715. — R. Burian, Zeitschr. f. phys. Ch. **43**. 479. 1905.



wird auch die Harnsäure zu Allantoin oxydiert, welch letzteres als unangreifbares Endprodukt des Purinstoffwechsels im Harn ausgeschieden wird. Das Allantoin muss daher — wiewohl nicht mehr den Purinring aufweisend — in physiologischer Beziehung zu den Purinsubstanzen gerechnet werden (siehe das folgende Schema).



In den folgenden Ausführungen ist daher unter Gesamt-Purinausscheidung die Allantoinausscheidung stets mit inbegriffen.

### 1. Die endogene Purinausscheidung.

Der bei purinfreier Ernährung vom Säugetier gelieferte endogene Purin-N-Wert zeigt, wie zuerst Burian und Schur und Siven für den Menschen festgestellt haben, pro 24 Stunden einen für das einzelne Individuum sehr konstanten Wert, unabhängig von der Menge der aufgenommenen Nahrung und des getrunkenen Wassers. Er hält sich bei gesunden Personen monate- und jahrelang auf der gleichen Höhe<sup>1)</sup>.

<sup>1)</sup> R. Burian und H. Schur, Pflügers Arch. **80**. 241. 1900. — Siven, V. O., skand. Arch. f. Phys. **11**. 123. 1900. — Burian und Schur, Pflügers Arch. **87**. 239. 1903. — Kaufmann und Mohr, Deutsch. Arch. f. klin. Med. **74**. 141, 384, 584. 1902. — Pfeil, l. c. — Burian und Schur, Pflügers Arch. **94**. 273. 1903. — E. W. Rockwood, Am. Journ. of phys. **12**. 38. 1904. — Bloch, Arch. f. klin. Med. **83**. 499. 1905. — Pierre Fauvell, C. r. ac. des sc. **142**. 1292. 1906. — I. R. Macleod und H. Haskins, Journ. of biol. Chem. **2**. 231. 1906.



Doch gilt diese Konstanz nur bei gleichmässiger Lebensweise und innerhalb gewisser, allerdings ziemlich weiter Schwankungen in der purinfreien Ernährung. Bei exzessiven Schwankungen in der Aufnahme von purinfreien Nahrungsstoffen findet schliesslich doch auch eine Änderung der Purinausfuhr statt<sup>1)</sup>. Im nüchternen Zustande (12 bis 15 Stunden) nach der letzten Nahrungsaufnahme stellt sich die Harnpuria-

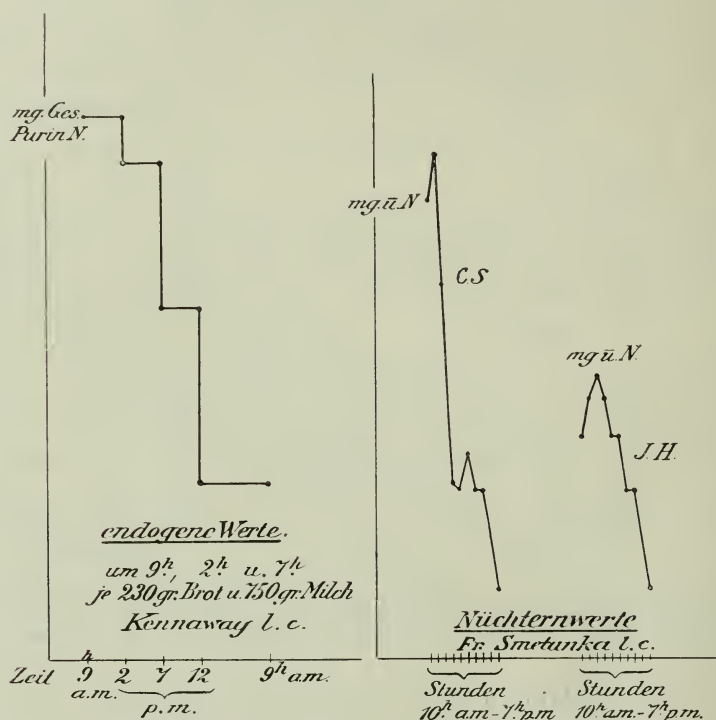


Fig. 42.

ausscheidung auf ein niedrigeres Niveau ein („Nüchternwert“, Mareš „Hungerstandard“, Burian<sup>2)</sup>). Im ausgesprochenen Hunger ist dann der Wert noch geringer, um im exzessiven Hunger wieder zu steigen<sup>3)</sup>.

<sup>1)</sup> Folin, Am. Journ. of phys. **13**. 66. 1905. — L. B. Mendel, Journ. of the am. med. ass. 1906. — Mareš, Pflügers Arch. **134**. 59. 1910.

<sup>2)</sup> Mareš, Arch. slaves, l. c. u. Pflügers Arch. **134**. 59. 1910. — Burian, Zeitschr. f. phys. Ch. **43**. 534. 1904. — Brugsch und Schittenhelm, Zeitschr. f. exp. Path. u. Th. **4**. 761. 1907. — Hirschstein, Arch. f. exp. Path. u. pharm. **57**. 229. 1907.

<sup>3)</sup> E. P. Cathcart, Bioch. Zeitschr. **6**. 109. 1907.

Untersucht man nicht 24 stündige, sondern kürzere Perioden, so zeigt sich schliesslich nach Aufnahme von purinfreier Kost beim nüchternen Menschen doch regelmässig eine vorübergehende Steigerung der Purinausscheidung<sup>1)</sup>. Diese Abweichungen von der im allgemeinen zu Recht bestehenden Konstanz des endogenen Wertes sind auf fehlende bzw. gesteigerte Verdauungsarbeit zu beziehen. Im strengen Sinne stellt nicht der endogene, sondern der „Nüchternwert“ die eigentliche individuell konstante Grösse des Purinstoffwechsels dar.

Die Ausscheidung der endogenen Harnpurine erfolgt in den 24 Stunden des Tages nicht gleichmässig, sondern in einer mehr minder regelmässigen Kurve, welche um die Mittagszeit ein Maximum und in den Abend- bzw. Nachtstunden ein Minimum aufweist (Fig. 42)<sup>2)</sup>. In dieser Kurve markiert sich die Aufnahme einer purinfreien Mahlzeit als Erhebung oder als Verschiebung des Maximums<sup>3)</sup>. Den höchsten Ausschlag bewirkt Eiweissaufnahme (Casein), nur wenig weniger wirken Kohlehydrate (Kartoffeln, Honig)<sup>4)</sup>. Die Steigerung setzt ungemein rasch nach der Aufnahme ein und kennzeichnet sich dadurch als durch die Verdauungsarbeit bedingt (Mareš, l. c.).

Über die Herkunft der endogenen Harnpurine sind verschiedene Vermutungen geäussert worden. Dass sie letzter Linie von im Körper zerfallenden Nucleinsäuren und somit den Nucleoproteiden, die ihrerseits einen Hauptbestandteil der Zellkerne ausmachen, abstammen müssen, erscheint heute unzweifelhaft und man wird daher die endogenen Harnpurine als Produkte des Kernstoffwechsels im allgemeinen aufzufassen haben, wie dies Mareš tut (Pflügers Archiv, l. c.). Diese Auffassung ist jedenfalls ansprechender als die Annahme Schittenhelms, dass die endogenen Harnpurine lediglich den absterbenden Zellen, „Mauserungsvorgängen“, ihren Ursprung verdanken, oder die verschiedenen Versuche einem bestimmten Organ hauptsächlich oder ausschliesslich ihre Bildung zuzuschreiben. In der letzteren Beziehung hat die Theorie von Horbaczewski<sup>5)</sup>, die Quelle der Harnpurine seien ausschliesslich zerfallende Leucocyten, am meisten zu weiteren Untersuchungen Anlass gegeben. Gegen dieselbe wurde hauptsächlich eingewendet, dass sich ein Parallelismus zwischen Hyperleukocytose und Harnsäuresteigerung beim Menschen nicht allemal fest-

<sup>1)</sup> Hirschstein, l. c. Shermann, Journ. am. chem. soc. **25**. 1159. 1905. — Hopkins und Hope, Journ. of phys. **23**. 289. 1898. — Smetanka, Pflügers Arch. **138**. 217. 1911.

<sup>2)</sup> Siven, Sk. Arch. f. Phys. **11**. 143. 1901. — Pfeil, l. c.; Hirschstein, l. c. — J. B. Leathes, Journ. of phys. **35**. 1907. — Kennaway, ebenda **38**. 1. 1909. — Smetanka, l. c.

<sup>3)</sup> Hirschstein, l. c.; Smetanka, l. c. — Cast. C. Douglas, Edinburgh med. Journ. 1901; Arch. f. Verdauungskrankh. **7**. 200. 1901. — Muskeltätigkeit, Burian, Zeitschr. ph. Ch. **43**. 532. 1904.

<sup>4)</sup> Smetanka, l. c.

<sup>5)</sup> Monatsh. f. Chem. **10**. 624. 1889.

stellen lasse. In allen Fällen von Leukocytose ist zwar die Harnsäureausscheidung gesteigert, aber es gibt auch Fälle von Harnsäuresteigerung ohne Leukocytose<sup>1)</sup>.

Hirschstein führt die endogenen Harnpurine auf den angeblichen Puringehalt der Verdauungssäfte zurück<sup>2)</sup>, welche aber von Brugsch und Schittenhelm purinfrei gefunden worden sind<sup>3)</sup>. Auch Mareš<sup>4)</sup> hält die Verdauungssäfte für eine Quelle der endogenen Harnpurine. Nach Siven<sup>5)</sup> hat die Verdauungsarbeit keinen Einfluss auf die Harnsäureausscheidung des Menschen. Als Quelle der endogenen Purine nimmt Siven die Muskeltätigkeit an. Die gleiche Anschauung, durch Versuche gestützt, vertritt Burian<sup>6)</sup>. In einer späteren Publikation führt Siven die endogene Purinausscheidung auf die Nierentätigkeit zurück<sup>7)</sup>. Gegen die Hypothese der Entstehung der endogenen Purine durch die Muskeltätigkeit wurden Beobachtungen an Muskelkranken bzw. bei an Krämpfen Leidenden angeführt, die mit ihr nicht in Einklang stehen<sup>8)</sup>.

Der 24 stündige endogene Purin-N-Wert des Menschen schwankt von Individuum zu Individuum nicht unerheblich. Die grössten beobachteten Schwankungen betrugen 0,08—0,25. Burian und Schur (l. c.) sowie Kaufmann und Mohr (l. c.) fanden im Mittel 0,15 und 0,20; Siven (l. c.) 0,15. Nach Brugsch und Schittenhelm<sup>9)</sup> sind Werte von 0,0—0,11 unternormal, 0,11—0,15 niedrignormal, 0,15 bis 0,22 hochnormal, und Werte über 0,22 übernormal. Beim neugeborenen Menschen ist die endogene Purinausscheidung relativ hoch (Zeit des Harnsäureinfarktes) und sinkt dann bei Brustnahrung auf sehr niedrige Werte (Trautner<sup>10)</sup>). Mittlere Hunde scheiden im Hunger 0,074—0,105 und Kaninchen im Hunger 0,021—0,027 Gesamtpurin-N in 24 Stunden aus (Wiechowski<sup>11)</sup>).

Der endogene Harnpurin-N-Wert zeigt, wie bereits hervorgehoben, keine Abhängigkeit von dem Gesamt-N des Harns. Gesteigerte Diurese

<sup>1)</sup> Mellis - Schirru, *Zentralb. f. i. Med.* **20**. 1041. 1899. — Weiss, *Zeitschr. f. phys. Chem.* **27**. 216. 1899. — Bohland, *Münch. med. Wochenschr.* 1899. 507. — Hopkins and Hope, *Journ. of phys.* **23**. 271. 1899. — Cast. C. Douglas, l. c.

<sup>2)</sup> *Arch. f. exp. Path. u. Pharm.* **57**. 229. 1907.

<sup>3)</sup> *Zeitschr. f. exp. Path. u. Th.* **4**. 761. 1907.

<sup>4)</sup> *Pflügers Arch.* l. c.

<sup>5)</sup> *Sk. Arch. f. Phys.* **11**. 123. 1901.

<sup>6)</sup> *Zeitschr. f. phys. Chem.* **43**. 532. 1905.

<sup>7)</sup> *Sk. Arch. f. Phys.* **18**. 193. 1906.

<sup>8)</sup> E. I. Striggs, *Quarterly Journ. of med.* **1**. 63. 1907. — Schittenhelm in Oppenheimers *Handb. d. Biochem.* **4**. 521. — Mit der Theorie von Burian stimmt der unten erwähnte Fall von Skutetzki (*Polymyositis acuta*) überein.

<sup>9)</sup> *Zeitschr. f. exp. Path. u. Th.* **4**.

<sup>10)</sup> *Nord. med. Arch.* **2**. 42. 1909 und unveröff. eigene Untersuch.

<sup>11)</sup> Hofmeisters *Beitr. z. chem. Phys. u. Path.* **11**. 109. 1907.

lässt ihn unbeeinflusst (Burian und Schur<sup>1)</sup>, Schöndorf<sup>2)</sup>). Eine einfache Beziehung zum Körpergewicht der einzelnen Individuen besteht nicht. Schwerere scheiden zwar mehr aus, aber die Steigerung des Körpergewichts erfolgt erheblich rascher. Ebenso scheint eine einfache Beziehung zu der Menge der im Hunger gleichzeitig ausgeschiedenen Phosphorsäure nicht zu bestehen, die eigentlich zu fordern wäre. Die Phosphorsäureausscheidung von Hunden und Kaninchen ist im Hunger erheblich grösser als der Gesamt-Purin-N-Ausscheidung entspricht, wenn man das Verhältnis Phosphorsäure zu Purin-N in der Thymonucleinsäure zugrunde legt (unveröffentlicht). Vielleicht ergibt sich eine derartige Beziehung beim normalen Brustkinde, das von beiden nur Spuren ausscheiden soll (vgl. zur Phosphatausscheidung der Säuglinge Moll<sup>3)</sup>).

Der sonst individuell konstante endogene Harnpurin-N-Wert ist durch verschiedene Einflüsse sowie durch Krankheit und Giftwirkung abänderbar. Durch Abkühlung<sup>4)</sup> und durch starke ungewohnte Muskelanstrengung<sup>5)</sup> wird er gesteigert. Beim Training verwischt sich diese Wirkung<sup>5)</sup>.

Das Fieber hat gleichfalls einen steigernden Einfluss<sup>6)</sup>. Ferner ist er in jenen krankhaften Zuständen erhöht, welche mit einer Hyperleukocytose oder der Bildung und Resorption zellreicher Exsudate einhergehen: Nach Milzexstirpation<sup>7)</sup>, bei der Lösung der Pneumonie<sup>8)</sup>, bei Leukämie<sup>9)</sup>, nach ausgedehnten Verbrennungen<sup>10)</sup> und nach Röntgenbestrahlung<sup>11)</sup>. Aus früheren Untersuchungen, welche

<sup>1)</sup> Pfügers Arch. I. c.

<sup>2)</sup> Pfügers Arch. **81**. 48. 1901. — Rulon jr. und Hawk, Journ. am. ch. soc. **32**. 1686. 1911.

<sup>3)</sup> Jahrb. f. Kinderheilk. **69**. N. F. **29**. 1909.

<sup>4)</sup> Proc. royal soc. **79**. 541. 1907. — Cathcart, Kennaway, Leathes, Quart. Journ. of med. **1**, 416. 1908.

<sup>5)</sup> Burian, Zeitschr. f. phys. Ch. **43**. 532. 1904. — Cathcart, Kennaway, Leathes, I. c. — Kennaway, Journ. of phys. **38**. 1. 1909. — Vgl. auch Herter und Smith, New York med. Journ. 1892. 617. — Sherman, Journ. of the am. ch. soc. **25**. 1159. — Rockwood, Am. Journ. of phys. **12**. 38. — Siven, Sk. Arch. **11**. I. c.

<sup>6)</sup> Cathcart, Kennaway, Leathes, I. c.; R. Mandel, Am. Journ. of phys. **10**. 452. — I. B. Leathes, Journ. of Phys. **35**. 205. 1907.

<sup>7)</sup> L. B. Mendel und B. Gibson, Am. Journ. of phys. **18**. 1907.

<sup>8)</sup> Fr. v. Müller, Ver. d. naturf. Ges. Basel **13**. Mai 1901. — O. Simon, Arch. f. klin. Med. **70**. 604. 1901. — Carlyle Pope, Zentralbl. f. inn. Med. **20**. 657. 1899.

<sup>9)</sup> Unter anderen Y. Henderson und H. Edwards, Am. Journ. of phys. **9**. 417. — Brugsch und Schittenhelm, Zeitschr. f. exp. Path. u. Th. **4**. 481. 1907.

<sup>10)</sup> Horbaczewski, Monatsh. f. Ch. **12**. 234. 1891.

<sup>11)</sup> Br. Bloch, Deutsch. Arch. f. klin. Med. **83**. 499. 1905. — P. Linser und K. Sick, ebenda **89**. 413. 1907. — H. Königsberger, ebenda, **87**. 31. 1906. — Heile, Zeitschr. f. klin. Med. **55**. 598. 1904. — Röntgenbestrahlung bei Leukämie: B. Vas, Zeitschr. f. klin. Med. **68**. 1909. — Rosenbaum, Diss. Leipzig 1907. — Williams, Biochem. Journ. **1**. 249. 1906. — I. Rosenstern, Dissert. München 1906.



allerdings nicht nur die endogene Ausscheidung berücksichtigt haben, aber bei denen wahrscheinlich nur diese bestimmt worden ist, scheint hervorzugehen, dass bei Lebercarcinom eine Steigerung des endogenen Purinwertes vorkommt<sup>1)</sup>. Wir hatten Gelegenheit, einen Patienten, der an familiärer Adipositas und Lebercarcinom litt, zu untersuchen und seine endogene Purinausscheidung durch längere Zeit zu verfolgen. Der Gesamt-Purin-N schwankte nicht unerheblich von Tag zu Tag, zeigte aber immer bis zum Tode die enorme Höhe von mindestens 0,5 pro die. (Bass und Krecmanowicz, unveröffentlicht.)

Bei der Gicht bewegt sich die endogene Purinausscheidung in einer grossen Anzahl von Fällen an der unteren Grenze der Norm oder ist ausgesprochen unternormal<sup>2)</sup>. In einem Falle von Polymyositis acuta fand Skuteztky sehr niedrige Harnsäurewerte, bis 0,025 pro die<sup>3)</sup> und Rosenberger<sup>4)</sup> fand sehr niedrige Werte bei Pankreaserkrankungen.

Die Beeinflussung der endogenen Purinausscheidung durch Arzneimittel und Gifte ist bisher systematisch nicht untersucht worden, aus dem vorliegenden Material geht hervor, dass eine Vermehrung verursachen: Pilocarpin<sup>5)</sup>, Glycerin<sup>6)</sup>, die Phosphorvergiftung beim Menschen<sup>7)</sup>. Ich fand die Purinausscheidung der Kaninchen bei der P-Vergiftung nicht verändert (unveröffentlicht). Salicylsäure<sup>8)</sup>.

Zufuhr von Alkohol wirkt steigernd auf die Ausscheidung, Landau<sup>9)</sup>, Schittenhelm<sup>10)</sup>. Nach anderen Autoren hat er auf die endogene Ausscheidung keinen Einfluss<sup>11)</sup>. Deutlich steigernd wirkt Radiumemanation<sup>12)</sup> und Thorium-X<sup>13)</sup>, auch Oxalsäure soll so wirken<sup>14)</sup> und gewisse Mineralquellen (Schwefelwässer, Brown<sup>15)</sup>), das Wasser von S. Pellegrino<sup>16)</sup> und in ganz hervorragender Weise beim Menschen

<sup>1)</sup> Pott, R., Pflügers Arch. **46**. 509. 1890. — Horbaczewski, Monatsh. f. Ch. **12**. 322. 1891.

<sup>2)</sup> Brugsch und Schittenhelm, Zeitschr. f. exp. Path. u. Th. **4**. 1907.

<sup>3)</sup> Münch. med. Wochenschr. 1912. Nr. 11.

<sup>4)</sup> Zeitschr. f. Biologie **48**. 529. 1906.

<sup>5)</sup> Mareš, Arch. slaves, l. c. — Horbaczewski, Monatsh. f. Ch. **12**. 322. 1891.

<sup>6)</sup> Horbaczewski und Kanera, ebenda, **7**. 105. 1886.

<sup>7)</sup> Münzer, E., Zentralbl. f. klin. Mediz. **13**. Nr. 24. 1892.

<sup>8)</sup> Bohland, Zentralbl. f. inn. Med. **17**. 70. 1896. — P. Fauvel, C. r. ac. des sc. **144**. 932. 1907. — Schreiber und Baudy, Arch. f. klin. Med. **62**. 242. 1899. — Burian, Zeitschr. f. ph. Ch. **53**. 497. 1905. — Rockwood und Epps, Am. Journ. phys. **19**. 97. 1907.

<sup>9)</sup> Arch. f. klin. Med. **95**. 280. 1909.

<sup>10)</sup> Zeitschr. f. phys. Ch. **62**. 97. 1909.

<sup>11)</sup> Beebe, Am. Journ. pf phys. **12**. 13. 1904. — Chittenden und Beebe, ebenda. — Proc. of the am. phys. soc. 1903. XI. — Weiss, Münch. med. Wochenschr. 1901. 1048. — Haeser, Dissert. Greifswald. 1901. — Rosemann, Deutsche chem. Wochenschr. 1901. 531.

<sup>12)</sup> Gudzent, med. Kl. 1910. 42.

<sup>13)</sup> Plesch und Karczag, Münch. med. Wochenschr. 1912.

<sup>14)</sup> Montuori, Rend. conti della R. ac. de la sc. Napoli 1911. fasc. 12.

<sup>15)</sup> Brit. med. Journ. 1910. 421.

<sup>16)</sup> Gilardino, Therap. Monatsh. **18**. 69. 1904.

die 2-Phenyl-chinolin-4-Carbonsäure, das Atophan<sup>1)</sup>). Die Angaben über die steigernde Wirkung des Hydrazins konnten nicht bestätigt werden (siehe bei Allantoin). Ob alle diese Substanzen auf den Purinstoffwechsel wirken und die beobachtete Steigerung nicht indirekt auf dem Umwege über die Leukozyten wirkt oder ob es sich schliesslich nicht um eine Beeinflussung der Ausscheidung handelt, ist noch nicht festgestellt. Das Atophan macht jedenfalls keine Leucocytose. Zufuhr von Alkalien, von denen man sich beim Menschen seinerzeit viel versprochen hat, wirken nicht<sup>2)</sup>).

Die endogene Purinausscheidung setzten herab: Atropin (Horbaczewski<sup>3)</sup>), Chinin (Horbaczewski<sup>3)</sup>, R. Daniel<sup>4)</sup>), Lecithin

<sup>1)</sup> Arthur Nicolaier und Max Dohrn, Über die Wirkung von Chinolincarbonensäuren und ihrer Derivate auf die Ausscheidung der Harnsäure. Deutsches Arch. f. klin. Med. **93**. 1908. — E. A. Tschernikow und J. S. Magat, Zur Frage des Einflusses der Phenyleinchoninsäure (Atophan) auf die Harnsäureausscheidung bei Gicht und Gelenkrheumatismus. Vorläufige Mitteilung. Charkower med. Journ. 1910. — W. Weintraud, Die Behandlung der Gicht mit Phenyleinchonincarbonensäure (Atophan) nebst Bemerkungen über die diätetische Therapie der Krankheit. Ther. d. Gegenw. März 1911. — Ernst Heller, Atophan bei Gicht und akutem Gelenkrheumatismus. Berl. klin. Wochenschr. 1911, Nr. 12. — K. Georgiewsky, Phenyleinchoninsäure (Atophan) bei Gicht. Deutsche med. Wochenschr. 1911, Nr. 22. — E. Starkenstein, Über die Beeinflussung des Purinstoffwechsels durch Phenyleinchoninsäure (Atophan). Arch. f. exp. Path. u. Pharm. **65**, 3. u. 4. Heft, S. 177—196. 1911. — Weintraud, Zur Wirkung der 2-Phenyleinchonin-4-carbonsäure (Atophan) bei der Gicht. Verhandl. d. deutsch. Kongr. f. inn. Med. 1911. — Bernard Bauch, Über die Einwirkung der 2-Phenyleinchonin-4-carbonsäure (Atophan) auf den Harnsäurestoffwechsel des gesunden und gichtkranken Menschen. Inaug.-Dissert. Heidelberg 1911. — E. Frank und B. Bauch, Über den Angriffspunkt des Atophans bei seiner Einwirkung auf die Harnsäureausscheidung. Berl. klin. Wochenschr. 1911, Nr. 32. — K. Fromherz, Zur Kenntnis der Wirkungsweise der Phenyleinchoninsäure auf den Purinstoffwechsel des Hundes. Biochem. Zeitschr. **35**. 5. u. 6. Heft. 1911. — G. Zuelzer, Über die Diagnose der Gicht durch Atophan. Berl. klin. Wochenschr. 1911, Nr. 47. — W. Skorzewski und J. Sohn, Über einige im Atophanharn auftretende charakteristische Reaktionen. Wien. klin. Wochenschr. 1911, Nr. 49. — E. Frank, Atophan und Harnsäure. Sitzungsber. d. Schles. Gesellsch. f. vaterländ. Kultur. Med. Klin. 1911, Nr. 50. — P. F. Richter, Über Wesen und Behandlung der Gicht. Deutsche med. Wochenschr. 1911, Nr. 51. — F. Deutsch, Über die Wirkung des Atophans bei Gesunden und Gichtkranken. Münch. med. Wochenschr. 1911, Nr. 50. — A. Schittenhelm und J. Schmid, Die Gicht und ihre Therapie. Samml. zwangloser Abhandl., herausgegeb. von Prof. Albu. 2. Heft 7. S. 48—50. — Plehn, Zur Kenntnis der Wirkungsweise der Phenyleinchonincarbonensäure (Atophan) bei chronischer Gicht. Deutsche med. Wochenschr. 1912, Nr. 3. — W. Weintraud, Weitere klin. Erfahrungen mit Atophan nebst Bemerkungen über Gicht und Harnsäurediathese. Therap. Monatsh. Jan. 1912. — Retzlaff, Über Atophantherapie bei der Gicht. Sitzungsber. d. Vereins f. inn. Med. u. Kinderheilk., Berlin. Jan. 1912. Deutsche med. Wochenschr. 1912, Nr. 9. — M. Dohrn, Über Farbreaktionen, speziell die Diazoreaktion im Atophanharn. Münch. med. Wochenschr. 1912, Nr. 10. S. 568; Über die Wirkung des Atophans mit einem Beitrag zur Theorie der Gicht. Zeitschr. f. klin. Med. **74**. 1912.

<sup>2)</sup> Rockwood und Epps, Am. Journ. of phys. **19**. 97. 1907. — Fauvel, La ref. alim. 11. Subkow. Dissert. Moskau 1903. I. T. 33.

<sup>3)</sup> Monatsh. f. Ch. **12**. 232. 1891.

<sup>4)</sup> Dissert. Bonn 1898.

(Aly Zaky<sup>1)</sup>, der Emser Kränchenbrunnen (Laqueur<sup>2)</sup>), das Calciumchlorid bei Tier und Mensch (Lubieniecki) und Starkenstein<sup>3)</sup>), das Atophan beim Hund und Kaninchen (Starkenstein<sup>4)</sup>). Während das Tannin nach einigen Autoren herabsetzend wirkt<sup>5)</sup>, wirkt es nach Ulrici gar nicht<sup>6)</sup> und nach Reichenau<sup>7)</sup> steigend. Die Alkalien wirken nicht<sup>8)</sup> und ebensowenig die hippursäurebildenden Substanzen, denen man eine Zeitlang eine herabsetzende Wirkung zugeschrieben hat<sup>9)</sup>.

## 2. Die exogene Ausscheidung.

Werden Purine oder purinhaltige Stoffe aufgenommen, so steigt der Purin-N des Harns um einen gewissen Betrag, den man als exogenen Harnpurinwert bezeichnet (Burian und Schur l. c.). Für die Beurteilung der exogenen Purinausscheidung und für die Auswahl von Kostordnungen mit bekanntem Puringehalt ist die Kenntnis des Purinstoffgehaltes der einzelnen Nahrungsmittel notwendig. Diesbezügliche Daten enthält die folgende Tabelle.

100 g enthalten	Purin-N			Purinbasen	Allantoin
	I.	II.	III.	IV.	
Rindfleisch . . . . .	—	0,052	0,037	0,175	—
Kalbfleisch . . . . .	—	0,046	0,038	0,178	—
Hammelfleisch . . . . .	—	0,039	0,026	0,189	—
Schweinefleisch . . . . .	—	0,048	0,041	0,181	—
Schinken . . . . .	—	0,046	—	—	—
gekochter Schinken . . . . .	—	—	0,025	—	—

I. R. Burian und H. Schur, Pflügers Arch. 80. 241. 1900. II. Walker Hall, Dissert. Owens Coll. Manchester 1902. III. G. Bessau und J. Schmid, Therap. Monatsh. 1910. 116. IV. Th. Brugsch und A. Hesse, Med. Kl. 1910. 623.

Ferner hat W. Hall Tafeln zur Berechnung des Puringehalts der Speisen veröffentlicht. The Purin bodies of foodstuffs. London 1902.

<sup>1)</sup> C. r. soc. biol. 53. 830. 1901.

<sup>2)</sup> Berl. klin. Wochenschr. 1903. 50.

<sup>3)</sup> Unveröffentlicht.

<sup>4)</sup> Unveröffentlicht.

<sup>5)</sup> Rappoport, Diss. Bonn 1900; Dölff, Dissert. Bonn 1898.

<sup>6)</sup> Dissert. Marburg 1901. Arch. f. exp. Path. u. Pharm. 46. 321. 1901.

<sup>7)</sup> Biochem. Zeitschr. 21. 76. 1909.

<sup>8)</sup> Rockwood und Epps, Am. Journ. of phys. 19. 97. 1907. — Gilardoni, Therap. Monatsh. 18. 69. 1904. — Fauvel, La ref. alim 11. 245. 1907; vgl. auch Subkow, Dissert. Moskau 1903. J. T. 33.

<sup>9)</sup> Chinasäure: de la Camp, Münch. med. Wochenschr. 1901. 1203. — A. Nikolaier und I. Hagenberg, Zentralbl. f. Stoffw. u. Verdauungskrankh. 1. 131. 1900. — Taltavall und Gies, Am. Journ. of phys. 9. Proc. am. Phys. soc. 12. 1903. — Ulrici, Dissert. Marburg 1901; Arch. f. exp. Path. u. Pharm. 6. 321. 1901. — Benzoessäure: Lewandowsky, Zeitschr. f. inn. Med. 40. 202. 1900. — Hupfer, Zeitschr. f. phys. Ch. 37. 302. 1900.

100 g enthalten	P u r i n - N			Purin- basen IV.	Allantoin
	I.	II.	III.		
roher Schinken . . . . .	—	—	0,024	—	—
Lachs-Schinken . . . . .	—	—	0,057	—	—
Kalbszunge . . . . .	—	—	0,055	—	—
Kaldaunen . . . . .	—	0,023	—	—	—
Rehfleisch . . . . .	—	0,030	—	0,182	—
Kaninchenfleisch . . . . .	—	0,038	—	—	—
Fleisch . . . . .	0,06	—	—	—	—
Huhn . . . . .	—	0,052	0,029	0,186	—
Taube . . . . .	—	—	0,058	0,154	—
Gans . . . . .	—	—	0,033	—	—
Fasan . . . . .	—	—	0,034	—	—
Hühner-Eier . . . . .	0,00	0,01	0,000	Spur	0,00 <sup>1)</sup>
Kabeljau . . . . .	—	0,023	0,038	0,131	—
Schellfisch . . . . .	—	—	0,039	—	—
Schleie . . . . .	—	—	0,027	—	—
Aal, geräuchert . . . . .	—	0,027	—	—	—
Lachs . . . . .	—	0,047	0,024	0,201	—
Karpfen . . . . .	—	—	0,054	—	—
Bückling . . . . .	—	—	0,029	—	—
Zander . . . . .	—	—	0,045	—	—
Hecht . . . . .	—	—	0,048	—	—
Hering . . . . .	—	—	0,069	—	—
Forelle . . . . .	—	—	0,056	0,213	—
Sprotten . . . . .	—	—	0,088	—	—
Ölsardinen . . . . .	—	—	0,118	—	—
Sardellen . . . . .	—	—	0,078	—	—
Anchovis . . . . .	—	—	0,145	—	—
Scholle . . . . .	—	0,032	—	—	—
Heilbutt . . . . .	—	0,041	—	—	—
Seezunge . . . . .	—	—	—	0,137	—
Kaviar . . . . .	—	—	0,000	0,110	—
Hummer . . . . .	—	—	0,023	—	—
Krebse . . . . .	—	—	0,020	—	—
Austern . . . . .	—	—	0,029	0,217	—
Froschmuskeln enthalten 0,02— 0,03% Purin-N (V. Scaffidi, Bioch. Zeitschr. 30. 473. 1911					
Leber (Rind) . . . . .	0,120	0,110	0,093	0,372	—
Gehirn (Schwein) . . . . .	—	—	0,028	0,233	—
Niere . . . . .	—	—	0,080	0,320	—
Milz . . . . .	0,160	—	—	0,320	—
Thymus . . . . .	0,450	0,402	0,330	1,308	—
Lunge . . . . .	—	—	0,052	—	—
Leberwurst . . . . .	—	—	0,038	—	—
Braunschweigerwurst . . . . .	—	—	0,010	—	—
Mortadellawurst . . . . .	—	—	0,012	—	—

<sup>1)</sup> Acroid, H., Bio-chem. Journ. 5. 400. (1911).



100 g enthalten	Purin-N			Purin- basen IV.	Allantoin
	I.	II.	III.		
Salamiwurst . . . . .	—	—	0,023	—	—
Blutwurst . . . . .	—	—	0,000	—	—
Bouillon (100 g Fleisch) . . .	—	—	0,015	—	—
Milch . . . . .	0,005	0,01	0,000	—	vorhanden <sup>1)</sup>
Milch-, Edamer-, Schweizer-, Tilsiter-, Gervais-Käse . . .	—	—	0,000	—	—
Sahnekäse . . . . .	—	—	0,005	—	—
Kuhkäse . . . . .	—	—	0,022	—	—
Hafermehl . . . . .	—	0,021	—	0,100	—
Erbsenmehl . . . . .	—	0,018	0,026	0,108	reichlich <sup>1)</sup>
Linsenmehl . . . . .	—	—	0,054	—	—
Bohnen . . . . .	—	0,025	0,027	—	reichlich
Weizenmehl . . . . .	—	—	—	0,116	0,0 <sup>2)</sup>
Roggenmehl . . . . .	—	—	—	0,096	—
Cerealien (Gries, Graupen, Sago)	0,000	—	0,000	—	—
Tapioka . . . . .	—	0,000	—	—	—
Weissbrot . . . . .	Spur	—	0,000	—	Spuren <sup>1)</sup>
Schwarzbrot . . . . .	0,01	—	—	—	—
Kartoffel . . . . .	0,0005	0,0007	0,002	0,019	? <sup>2)</sup>
Zwiebel . . . . .	—	0,003	0,000	—	—
Spargel . . . . .	—	0,009	0,009	0,057	0,0 <sup>2)</sup>
Kohl . . . . .	0,000	0,000	—	—	—
Blumenkohl . . . . .	—	0,000	—	0,078	—
Welschkraut . . . . .	—	—	0,007	—	vorhanden <sup>2)</sup>
Weisskraut, Mohrrübe . . . .	—	—	0,000	—	—
Grünkohl . . . . .	—	—	0,002	—	—
Braunkohl . . . . .	—	—	0,002	—	—
Kohlrabi . . . . .	—	—	0,011	—	—
Kopfsalat . . . . .	—	0,000	0,003	—	—
Gurken . . . . .	—	—	0,000	—	—
Radieschen . . . . .	—	—	0,005	—	—
Spinat . . . . .	—	—	0,024	—	—
Rapunzel . . . . .	—	—	0,011	—	—
Sellerie . . . . .	—	—	0,005	—	—
Karoten . . . . .	—	—	—	0,007	—
Weisse Bohnen . . . . .	—	—	—	0,098	—
Grüne Erbsen . . . . .	—	—	—	0,079	—
Schnittbohnen . . . . .	—	—	0,002	Spur	—
Schoten . . . . .	—	—	0,027	—	—
Obst . . . . .	—	—	0,000	—	—
Steinpilze . . . . .	—	—	0,018	—	—
Pfefferlinge . . . . .	—	—	0,018	—	—
Morcheln . . . . .	—	—	0,011	—	—
Champignon . . . . .	—	—	0,005	—	—
Lagerbier . . . . .	—	0,005	—	—	—
einfaches Bier . . . . .	—	—	0,004	—	—
Kulmbacher Bier . . . . .	—	—	0,001	—	—
Ale . . . . .	—	0,006	—	—	—
Porter . . . . .	—	0,006	—	—	—

<sup>1)</sup> Acroïd l. c.<sup>2)</sup> A. Scheib, unveröffentlicht.

100 g enthalten	P u r i n - N				Allantoin
	I.	II.	III.	IV.	
Claret . . . . .	—	0,000	—	—	—
Volnay . . . . .	—	0,000	—	—	—
Sherry . . . . .	—	0,000	—	—	—
Portwein . . . . .	—	0,000	—	—	—
Rotwein . . . . .	—	—	0,000	—	—
Rum . . . . .	—	—	0,000	—	—

Dem ist noch hinzuzufügen, dass Kaffee, Tee und Kakao reichliche Mengen von Purinstoffen enthalten. Hervorzuheben ist auch, dass von den Vegetabilien Bohnen, Erbsen, Hafer, Spinat u. a. nicht zu vernachlässigende Mengen von Purinen enthalten, ebenso wie gewisse Biere<sup>1)</sup>, was die Richtigkeit der allgemeinen Annahme, dass eine vegetarische Diät purinfrei sei, einigermaßen einschränkt. Von den wenigen bisher darauf untersuchten Nahrungsmitteln erwiesen sich verhältnismässig viele allantoinhaltig. Der Allantoingehalt ist insbesondere in der Milch und in den Leguminosen nicht unbeträchtlich, jedenfalls nicht zu vernachlässigen. Eine streng purinfreie Diät kann nach der gegebenen Übersicht nur aus Milch und Milchprodukten (Butter, Käse), Eiern, Zucker, Kartoffeln, Reis, Tapioca, Kohl, Kopfsalat, Weizenmehl und Weissbrot bestehen. Soll sie gleichzeitig allantoinfrei sein, so muss man sich auf Mehlspeisen, Eier, Speck und Kartoffeln beschränken und namentlich Milch vermeiden. Für die purinfreie und allantoinfreie Ernährung von Hunden und Kaninchen würde sich am besten Reis eignen, wozu bei Hunden noch Speck und Weissbrot, bei Kaninchen Weissbrot und Kohl hinzukäme.

Die Hauptmasse der mit der Nahrung aufgenommenen Purine ist in der Nucleinsäure gebunden, und dementsprechend sind es vorzugsweise die Aminopurine (s. o.), welche da in Betracht kommen. In Prozenten der Trockensubstanz enthielt Lunge: nach Kossel bestimmt 0,180 Guanin, 0,145 Adenin, 0,208 Hypoxanthin, 0,069 Xanthin; nach Burian bestimmt 0,227 Guanin, 0,232 Adenin, 0,226 Hypoxanthin, 0,059 Xanthin<sup>2)</sup>. In einem Kilo frischen Knochenmarks vom Pferde wurden gefunden: 0,3125 Guanin, 0,1710 Adenin, 0,072 Hypoxanthin, 0,0287 Xanthin<sup>3)</sup>. Von den verschiedenen Muskeln enthält Herzmuskel am meisten Purine, dann folgt der quergestreifte Skelettmuskel und dann die glatte Muskulatur<sup>4)</sup>.

Aber auch freie Purine sind in den Nahrungsmitteln reichlich enthalten. Im Fleisch und Fleischextrakt Hypoxanthin und Xanthin<sup>5)</sup>.

<sup>1)</sup> W. Hall, Berl. klin. Wochenschr. 1903. 868.

<sup>2)</sup> N. Sieber und W. Dzierzgowski, Zeitschr. f. ph. Ch. 62. 259. 1909.

<sup>3)</sup> H. Thar, Biochem. Zeitschr. 23. 43. 1909.

<sup>4)</sup> V. Scaffidi, Biochem. Zeitschr. 33. 247. 1911.

<sup>5)</sup> Krüger, Zeitschr. f. ph. Ch. 16. 161, 329. 1892; 18. 423. 1894; 21. 274. 1895/96. — K. Micko, Zeitschr. f. Unters. d. Nahr. u. Genussmittel 6. 781; 7. 257; 8. 225.

Im Tee Adenin<sup>1)</sup>. In Kaffee, Tee und Kakao die Methylxanthine: Kaffein (1-3-7-Trimethylxanthin), Theobromin (3-7-Dimethylxanthin), Theophyllin (1-3-Dimethylxanthin) und geringe Mengen von Monomethylxanthin<sup>2)</sup>. Im Zuckerrübensaft fand H. W. Bressler Xanthin, Hypoxanthin, Adenin und Guanin<sup>3)</sup>, im Kartoffelpresssaft E. Schulze Hypoxanthin<sup>4)</sup>. Auch im Saft des Zuckerrohres sind freie Purine enthalten<sup>5)</sup>, und in der Heringslake wurden Guanin, Hypoxanthin, Adenin, aber keine Methylpurine gefunden<sup>6)</sup>.

Für die Beurteilung der Grösse der exogenen Purinausscheidung im Vergleich mit der Einfuhr sind namentlich zwei Punkte wichtig. Zunächst sind von dem N der als Nucleinsäure gebunden oder als Aminobasen frei eingeführten Purine für die Bilanz nur 80% anzusetzen, da (siehe weiter unten) der Amino-N der Aminopurine (Guanin und Adenin) im Stoffwechsel abgespalten wird. Dieser Forderung ist unter den zahlreichen Bilanzen der Literatur, abgesehen von einigen neueren Arbeiten, nur von Krüger und Schmid Rechnung getragen worden (s. u. l. c.). Dann ist die Resorptionsgrösse der Purine vom Magen-Darmkanal aus zu berücksichtigen. Der Kot des Menschen enthält immer auch bei purinfreier Ernährung Purine, und zwar nicht unerheblich (Krüger und Schittenhelm<sup>7)</sup>); Schittenhelm fand 0,027 bis 0,258 Purin-N pro Tag<sup>8)</sup>, C. Tollens 0,12<sup>9)</sup>, C. Bartoletti 0,197<sup>10)</sup>. Die Kotpurine sind teils frei, zum grössten Teil aber als Nucleine und Nucleinsäuren gebunden. Ein grosser Teil wird von desquamierten Darmepithelien, ein kleinerer Teil von den Bakterien des Kotes geliefert. Die Galle enthält nichts, das Pankreassekret wenig (Schittenhelm<sup>11)</sup>). Danach kommt der Darm als Ausscheidungsort für zirkulierende Purine nicht in Betracht. Aus den Hydrolysaten des Menschenkots wurden erhalten: Guanin, Adenin, wenig Xanthin und Hypoxanthin. Harnsäure findet sich nach Schittenhelm nicht, nur im Mekonium (verschlucktes Fruchtwasser)<sup>12)</sup>, von anderen Untersuchern wurde sie jedoch im Kot gefunden<sup>13)</sup>. Die Basenausscheidung ist grösser als im Harn<sup>14)</sup>. Normalerweise ist sie ziemlich konstant. Sie wird

<sup>1)</sup> Krüger l. c. — Micko l. c.

<sup>2)</sup> M. Albanese, Arch. di farm. e Ter. **10**. 221. 1902.

<sup>3)</sup> Zeitschr. f. ph. Ch. **41**. 535. 1904.

<sup>4)</sup> Landwirtsch. Vers. **59**. 331. 1904.

<sup>5)</sup> C. E. Shorey, Journ. of am. ch. soc. 1899. 432.

<sup>6)</sup> S. Isaac, Dissert. Strassburg 1904; Hofmeisters Beitr. z. ch. Phys. u. Path. **5**. 500. 1904.

<sup>7)</sup> Zeitschr. f. ph. Ch. **35**. 153. 1902.

<sup>8)</sup> Arch. f. kl. Med. **81**. 423. 1904.

<sup>9)</sup> Zeitschr. f. inn. Med. **25**. 761.

<sup>10)</sup> Riv. crit. di cl. med. 1905. Nr. 50 (durch J. T. 36).

<sup>11)</sup> Arch. f. klin. Med. **81**. l. c.

<sup>12)</sup> Arch. f. klin. Med. **81** l. c. und **89**. 266. 1906.

<sup>13)</sup> Anselm Bellot, Thèse de Lyon 1906 (J. T. **37**. 388). — Fr. Galdi, II polielin. (1905) **12**. fasc. 34 (J. T. **35**. 442). — Bartoletti, l. c.

<sup>14)</sup> Krüger u. Schittenhelm, Zeitschr. f. ph. Ch. **35**. 153. 1902.

vermehrt durch schlackenreiche Nahrung (Zunahme der Kotpurine mit dem Trockengehalt der Fäzes), durch Diarrhöe und Pankreaserkrankung, vermindert durch Obstipation (Darmfäulnis) (Schittenhelm<sup>1)</sup>). Bei Leukämie fand Schittenhelm (l. c.) normale Werte, andere eine Vermehrung<sup>2)</sup>. Insbesondere steigt aber der Purinwert des Kots nach Einnahme von purinhaltigen Nahrungsmitteln und noch mehr nach Einnahme von freien Purinen. Ein beträchtlicher Teil der genossenen Purine wird also nicht resorbiert. I. W. Hall<sup>3)</sup> fand von verfüttertem Guanin beim Menschen 62—65% im Kote wieder, nach Thymuszulage betrug der Kot-Purin-N 0,177 gegen 0,01 in der Norm. Doch kann aus dem Puringehalte der Fäzes die Resorptionsgrösse nicht eindeutig erschlossen werden, da die Purine der Zersetzung durch die Darmbakterien sehr zugänglich sind<sup>4)</sup> und bei dieser Zersetzung der Purinring gespalten wird. — Schliesslich wird man auch mit der Möglichkeit einer Deponierung wenigstens gewisser Purine (Harnsäure) irgendwo im Körper rechnen müssen.

Von dem in den freien und gebundenen Purinen per os aufgenommenen N wird vom Menschen nur ein und zwar sehr wechselnder Anteil im Harn in Form von Purinstoffen ausgeschieden. Auch wenn man die mit dem Kote ausgeschiedenen Purine in Rechnung setzt, ist die Ausscheidung nur unvollständig. Die untersuchten anderen Säugetiere scheiden dagegen den aufgenommenen Purin-N vollständig und zwar so gut wie ausschliesslich im Harn aus.

Vom Stickstoff aufgenommener Purinstoffe wurde im Harn als Purin-N ausgeschieden:

#### I. Beim Menschen.

Adenin, per os . . . .	45 %	M. Krüger u. I. Schmid <sup>5)</sup>
	41 und 33 %	L. B. Mendel u. Lyman <sup>6)</sup>
	50 % (Gicht)	Brugsch u. Schittenhelm <sup>7)</sup>
Guanin, per os . . . .	0 %	Krüger u. Schmid <sup>5)</sup>
	(51 % in den Fäzes)	W. Hall <sup>8)</sup>
	22 % u. 34 %	Mendel u. Lyman <sup>6)</sup>
	0 % (Gicht)	Brugsch u. Schittenhelm <sup>7)</sup>
	29 % (Alkoholismus)	Rotky <sup>9)</sup>
	76 % (Diabetes)	„
	87 % (Polyurie)	„
		} Unter Berücksichtigung der Resorption.

<sup>1)</sup> Schittenhelm, Arch. f. klin. Med. 81. 423. 1904.

<sup>2)</sup> Bartoletti, l. c. Vas Zeitschr. f. klin. Med. 68. Heft 1/2. 1909.

<sup>3)</sup> Journ. of Path. und Bact. 2. 246. 1905.

<sup>4)</sup> Schittenhelm, Zeitschr. f. ph. Ch. 39. 199. 1903. — Schittenhelm und Schrotter, Zeitschr. f. Stoffw. u. Verdauungskrankh. 6. 319. 1905.

<sup>5)</sup> Zeitschr. f. phys. Ch. 34. 549. 1902.

<sup>6)</sup> Journ. biol. Chem. 8. 115. 1910.

<sup>7)</sup> Zeitschr. f. exp. Path. u. Therap. 5. 215. 1908.

<sup>8)</sup> Dissert. Manchester 1902.

<sup>9)</sup> Deutsch. Arch. f. kl. Med. 98. 540. 1910.



Hypoxanthin, per os . . . . .	46—66 %	Hall <sup>1)</sup> , Burian u. Schur <sup>2)</sup> , Minkowski <sup>3)</sup> , Krüger und Schmid (l. c.)
	59—68 %	Mendel u. Lyman (l. c.)
	13 % (Gicht)	Brugsch u. Schittenhelm (l. c.)
	62 % (Leukämie)	Rotky (l. c.)
	38 % (Nephritis)	„
	64—92 %	Landau <sup>4)</sup>
Xanthin, per os . . . . .	0 %	Rzentkowski <sup>5)</sup>
	10 %	Krüger u. Schmid (l. c.)
	47 u. 55 %	Mendel u. Lyman (l. c.)
	43 %	Burian u. Schur (l. c.), Unter Be- rücksichtigung der Ausscheidung in den Fäzes.
Xanthin-Natrium, per os . . . . .	0,7 %, 13 %, 38 % (27 % in den Fäzes), 70 %, 76 %, 42 %	Lewinthal <sup>6)</sup>
intravenös . . . . .	89 %	„
Harnsäure, per os . . . . .	0	Ibrahim u. Soetbeer <sup>7)</sup>
subkutan . . . . .	75—90 %	Dieselben, ebenda
„ . . . . .	61—82 %	Wiechowski <sup>8)</sup>
intramuskulär . . . . .	80 %	Benczur <sup>9)</sup>
intravenös . . . . .	100 %	Umber <sup>10)</sup>
Coffein, per os . . . . .	35—40 %	Burian u. Schur (l. c.)
	36 %	Lewinthal (l. c.)
subkutan . . . . .	14 %	„
Allantoin, subkutan . . . . .	88,3 %	Wiechowski (l. c.)
„ per os . . . . .	34,4 %	„
Nucleinsäure, per os . . . . .	41—56 % 7 %, 13 %, 42 %	Bloch <sup>11)</sup>
Unter Berücksichtigung der Ausscheidung mit den Fäzes: . . . . .	9 %, 16 %, 54 %	Frank u. Schittenhelm <sup>12)</sup>
Fleisch . . . . .	50 %	Burian u. Schur, l. c.
Unter Berücksichtigung der Ausscheidung in den Fäzes . . . . .	47—68 % 53—63 % 54—68 %	„ „ Hall, l. c. Kaufmann u. Mohr <sup>13)</sup>

<sup>1)</sup> l. c.<sup>2)</sup> Pflügers Arch. 80. 241. 1900 u. 87. 239. 1901.<sup>3)</sup> Deutsch. Arch. f. klin. Med. 95.<sup>4)</sup> Arch. f. exp. Path. u. Pharm. 42. 375. 1898.<sup>5)</sup> Arch. f. Verdauungskrankh. 11. 440. 1905.<sup>6)</sup> Zeitschr. f. phys. Ch. 77. 259. 1912.<sup>7)</sup> Zeitschr. f. phys. Ch. 35. 1. 1902.<sup>8)</sup> Arch. f. exp. Path. u. Pharm. 60. 185. 1909.<sup>9)</sup> Zeitschr. f. exp. Path. u. Th. 7. 339. 1909.<sup>10)</sup> Kongress f. inn. Med. vgl. auch Frank u. Bauch. Berl. klin. Wochen-  
schrift 48. 1463. 1911.<sup>11)</sup> Deutsch. Arch. f. klin. Med. 83. 500. 1905.<sup>12)</sup> Zeitschr. f. phys. Ch. 63. 269. 1909.<sup>13)</sup> Deutsch. Arch. f. klin. Med. 74. 121. 1902.

Thymus . . . . .	54—68 %	Kaufmann u. Mohr, l. c.
	8 % (3 % Gicht)	Lewinthal, l. c.
Leber u. Pankreas . . . . .	50 %	Burian u. Schur, l. c.
Leguminosen . . . . .	46—66 %	Fauvel <sup>1)</sup>
	45—56 %	Hall, l. c.
Heringsroggen . . . . .	10 %	Plimmer, Dick u. Lieb <sup>2)</sup>

## II. Beim Hund.

Hypoxanthin . . . . .	80 %	Minkowski, l. c.
Harnsäure, subkutan . . . . .	100 %	Wiechowski <sup>3)</sup>
Nucleinsäure, per os . . . . .	123 %, 114 %, 109%, 119 % <sup>4)</sup>	Schittenhelm <sup>5)</sup>
	72—88 %	Hirokawa <sup>6)</sup>
	25 % (Bleivergiftung)	„
Theobromin, per os . . . . .	55 %	Krüger u. Schmidt <sup>7)</sup>
Allantoin, subkutan . . . . .	100 %	Minkowski, (l. c.) Poduschka <sup>8)</sup>

## III. Kaninchen.

Harnsäure, subkutan . . . . .	50 %	Wiechowski <sup>3)</sup>
intravenös . . . . .	80 %	Schittenhelm u. Seisser <sup>9)</sup>
Allantoin, intravenös . . . . .	100 %	Dieselben, ebenda
Nucleinsäure, per os . . . . .	45—50 %	„ „
	100 %	„ „
Xanthin, intravenös . . . . .	75 % (ohne Allantoin)	Lewinthal, l. c.
Theobromin, per os . . . . .	25—31 %	Krüger u. Schmidt <sup>10)</sup>

## IV. Schwein.

Nucleinsäure, per os . . . . .	83 %, 129 %, 94 % <sup>4)</sup>	Schittenhelm <sup>11)</sup>
--------------------------------	---------------------------------	-----------------------------

Die Kurve der endogenen Purinausscheidung zeigt nach Zufuhr von purinhaltiger Nahrung einen raschen Anstieg, der in der fünften

<sup>1)</sup> C. r. ac. des sc. **143**. 72. 1906.

<sup>2)</sup> Journ. of phys. **39**. 98. 1909.

<sup>3)</sup> Beitr. z. ch. Phys. u. Path. Herausgeg. v. Fr. Hofmeister. **11**. 109. 1907.

<sup>4)</sup> Diese Zahlen sind aus den Angaben der Arbeiten so berechnet, dass nur 80 % des Purin-N der verfütterten Nucleinsäure als Aufnahme angesetzt wurden. (s. o.). Die in den beiden Arbeiten angegebenen Zahlen lauten für den Hund: 102 %, 92 %, 88 %, 98 %; für das Schwein: 66 %, 96 %, 75 %.

<sup>5)</sup> Zeitschr. f. phys. Ch. **62**. 80. 1909.

<sup>6)</sup> Biochem. Zeitschr. **26**. 441. 1910.

<sup>7)</sup> B. B. **32**. 2677.

<sup>8)</sup> Arch. f. exp. Path. u. Pharm. **44**. 59.

<sup>9)</sup> Zeitschr. f. exp. Path. u. Th. **7**. 116. 1909.

<sup>10)</sup> B. B. **32**. 2677 u. Arch. f. exp. Path. u. Pharm. **45**. 259. 1901.

<sup>11)</sup> Zeitschr. f. phys. Ch. **66**. 53. 1910.

Stunde sein Maximum erreicht, während das Maximum der N-Ausscheidung in die achte Stunde fällt (Mareš, Arch. slav., l. c., Pfeil l. c.). Mareš hält dieses Verhalten für einen Ausdruck der Purinvermehrung durch Verdauungsarbeit, die bei der Bewältigung von purinreichen Nahrungsstoffen besonders hochgradig sein soll (Pflügers Archiv, l. c.). Nach mässiger Aufnahme ist die exogene Purinausscheidung in 6—8 Stunden beendet (W. Hall, l. c.), kann aber nach sehr grosser Zufuhr bis zum 3.—5. Tage andauern (Burian und Schur<sup>1)</sup> und Bloch<sup>2)</sup>).

Bei der Gicht ist die exogene Purinausscheidung verzögert<sup>3)</sup>. Intravenös injizierte Harnsäure wird im Gegensatz zum Gesunden nur zu einem Teil ausgeschieden (Umber, l. c.), ebenso beim chronischen Alkoholismus<sup>4)</sup> und manchmal bei Lebercirrhose<sup>5)</sup>, Chinin und Tannin sollen die exogene Purinausscheidung nach Thymusgenuss verhindern<sup>6)</sup>. Alkohol während der Mahlzeit genossen steigert nach Chittenden u. Beebe die Harnsäureausscheidung, während er im nüchternen Zustande nicht wirkt (s. o.) oder gar die Purinausfuhr einschränkt<sup>7)</sup>. Nach neueren Untersuchungen soll das Atophan auch die exogene Purinausscheidung des Menschen vermehren<sup>8)</sup>. Hirokawa fand sie beim Hunde während schwerer Bleivergiftung stark herabgesetzt<sup>9)</sup>.

Aus den Daten für die Grösse der exogenen Purinausscheidung muss der Schluss gezogen werden, dass (bei schlechter Resorption der Purine aus dem Verdauungskanal beim Menschen) die in den Kreislauf gelangenden Purine (abgesehen von den methylierten Xanthinen) als solche unangreifbar sind und so gut wie quantitativ im Harn ausgeschieden werden (W. Wiechowski<sup>10)</sup>, Siven<sup>11)</sup>). Dafür spricht auch die individuelle Konstanz der endogenen Harnpurinausscheidung. Der endogene Purinstoffwechsel ist vom exogenen völlig unabhängig; der letztere addiert sich einfach zu ersterem (Siven, l. c.).

<sup>1)</sup> l. c.

<sup>2)</sup> Arch. f. klin. Med. 83. 517, 1905.

<sup>3)</sup> Brugsch und Schittenhelm, Zeitschr. f. exp. Path. u. Th. 4. 480. 1907 — Vogt, Reach, Kaufmann und Mohr, Brugsch, Nirschstein, Besser; zit. nach Umber, Therap. d. Gegenw. Febr. 1909.

<sup>4)</sup> Landau, Arch. f. klin. Med. 95. 280. 1909. — Schittenhelm, Zeitschr. f. exp. Ch. 62. 97. 1909. — L. Pollak, Arch. f. klin. Med. 88. 224. 1907.

<sup>5)</sup> B. Bloch, Ebenda, 93. 499. 1903.

<sup>6)</sup> R. Daniel, Dissert. Bonn 1898.

<sup>7)</sup> Am. Journ. of ph. 9. Proc. of the am. phys. soc. 5. 1903.

<sup>8)</sup> Ausscheidung injizierter Harnsäure beim Menschen, Frank und Bauch, Berl. klin. Wochenschr. 48. 1463. 1911. — Purinausscheidung nach Nukleinsäurezufuhr, dieselben. — Bauch, Diss. Heidelberg 1911. Arch. f. Verdauungskrankh. 17. 1911. — Deutsch, Münch. med. Wochenschr. 1911. Nr. 50. — Frank und Przedborski, Arch. f. exp. Path. u. Pharm. 68. 349. 1912. Nach Hypoxanthinfütterung dieselben, ebenda.

<sup>9)</sup> l. c.

<sup>10)</sup> Biochem. Zeitschr. 19. 377. 1909.

<sup>11)</sup> Pflügers Arch. 145. 297. 1912.

Der Organismus braucht keine exogenen Purine. Ein Ansatz — wie beim Eiweiss — findet nicht statt.

Der obige für das Studium des Purinhaushalts ausschlaggebende Schluss ist gegenwärtig noch nicht allgemein, aber von vielen anerkannt. Insbesondere stehen Brugsch und Schittenhelm noch auf dem Boden der alten Annahme, dass die Purinstoffe beim Menschen zu Harnstoff oxydiert werden und nur zu dem Bruchteil, der nach Nucleinsäurefütterung von deren Purin-N als solcher im Harn erscheint, der Umwandlung zu Harnstoff entgehen. — Die Annahme von Burian und Schur jedoch, dass von den aufgenommenen und im Organismus gebildeten Purinen ein für die einzelnen Säugetierarten spezifischer, konstanter Bruchteil (Integrativfaktor) zerstört werde, ist wohl endgültig aufgegeben.

### 3. Die Verteilung der Purinstoffe im Harn und ihr Schicksal im Organismus.

Die Gesamtpurinausscheidung lässt sich in drei Gruppen sondern, welche verschiedene Oxydationsstufen darstellen: Basen (Adenin-Hypoxanthin, Guanin-Xanthin) — die Methylxanthine sind als rein exogen und weil sie ausserdem ein anderes Schicksal haben ausser Betracht gelassen —, Harnsäure und Allantoin. Die Verteilung der Gesamtpurinausscheidung auf diese drei Gruppen ist bei den verschiedenen Säugetierarten nicht gleich. Es lassen sich in dieser Beziehung zunächst zwei scharf getrennte Abteilungen unterscheiden. (Soweit die einzelnen Säugetiere untersucht sind.) Die eine bildet der Mensch und die anthropoiden Affen, die andere alle anderen Säugetiere mit Einschluss der niedrigen Affen.

Beim Menschen und den anthropoiden Affen (untersucht ist der Schimpanse, *Troglodytes niger*)<sup>1)</sup> wird die Hauptmenge der Harnpurine, ca. 90% und mehr, von der Harnsäure gebildet. Allantoin und Basen werden nur in sehr geringer Menge ausgeschieden. — Bei den übrigen Säugetieren wird die Hauptmenge der Purinausscheidung vom Allantoin gebildet, Harnsäure und Basen treten ganz zurück<sup>1)</sup>. Praktisch wird also die Gesamt-Purinausscheidung beim Menschen und Anthropoiden von der Harnsäure, bei den übrigen Säugern vom Allantoin dargestellt. Der Purinstoffwechsel ist daher beim Menschen an der Harnsäure, bei den übrigen Säugetieren dagegen am Allantoin zu studieren und nicht — wie dies noch gegenwärtig mitunter geschieht — auch an der Harnsäure.

Der geringe, von der Harnsäure übrig gelassene Purinrest verteilt sich beim Menschen derart, dass die Basen das Allantoin überwiegen. Ja es ist noch nicht ganz sichergestellt, ob die geringen Allantoinmengen des

<sup>1)</sup> W. Wiechowski, Festschrift für v. Jaksch. Prager med. Wochenschr. 37. 1912. Nr. 22.



Menschenharns nicht rein exogenen Ursprungs sind (siehe weiter unten bei Allantoin), und in den Proben Schimpansenharns, die ich untersuchen konnte, habe ich überhaupt kein Allantoin gefunden (was allerdings nur beweist, dass die Menge sehr gering war). Unter den Basen wiederum überwiegen die Oxypurine weitaus über die primären Bausteine der Nucleinsäure, die Aminopurine, und unter den Oxypurinen nimmt die höchste Oxydationsstufe, das Xanthin, an Masse die erste Stelle ein.

In der Abteilung der übrigen Säugetiere verteilt sich der nach Abzug des Allantoins bleibende geringe Rest der Gesamt-Purinausscheidung auf Harnsäure und Basen in einer bei den einzelnen Arten verschiedenen Weise. Es lassen sich da zwei Typen unterscheiden; eine solche, bei der die Harnsäureausscheidung überwiegt und eine, bei der die Basenausscheidung überwiegt. Zu der letzteren gehört das Schwein und das Pferd<sup>1)</sup>, zu der ersteren das Rind<sup>1)</sup>, das Kaninchen und der Hund.

Nach dem oben gezogenen Schlusse, dass die Purinausscheidung quantitativ sei, muss die Verteilung der Purine auf die einzelnen Gruppen ein genaues Bild des intermediären Purinstoffwechsels der einzelnen Säugetierarten sein. Dass die höchste Oxydationsstufe in grösster Menge vorhanden ist und unter den niedrigeren Oxydationsstufen wieder die höheren überwiegen, spricht für einen allmählichen Abbau und kennzeichnet die in geringerer Menge ausgeschiedenen Purine als intermediäre Produkte. In der Tat stimmen alle Befunde, die man sonst beim Studium des Purinstoffwechsels gemacht hat, mit den Schlüssen überein, die man aus der Verteilung der Purinsubstanzen im Harn ableiten kann.

Zunächst ist die Verteilung der Purine im Harn bei purinhaltiger Kost die gleiche wie bei purinfreier<sup>2)</sup> (abgesehen von den eine andere Stellung einnehmenden Methylxanthinen), d. h. die exogenen Purine unterliegen dem gleichen Schicksal wie die endogenen, soweit sie in den Kreislauf gelangen. Immer ist beim Menschen die Harnsäure, beim Säugetier sonst das Allantoin vermehrt<sup>3)</sup>.

Es konnte ferner ein stufenweiser Abbau der Aminobasen zu Oxybasen, der Oxybasen zu Harnsäure, der Harnsäure zu Allantoin beim Studium der Wirkungen von überlebenden Organen auf die Purinstoffe in allen Einzelheiten beobachtet werden. Es zeigte sich, dass jeder Oxydationsstufe eine bestimmte Fermentleistung im Überlebensversuche entspricht: Adenase, Guanase, Xanthinoxidase, Uricooxidase.

<sup>1)</sup> A. Schittenhelm und E. Bendix, *Zeitschr. f. ph. Ch.* 48. 140. 1906. — Schittenhelm, ebenda, 46. 354. 1905. — Laf. B. Mendel und Lymann, *Journ. of biol. Ch.* 8. 115. 1910.

<sup>2)</sup> Burian u. Schur, *Pflügers Arch.* 80. 1. c.

<sup>3)</sup> Schittenhelm, *Zeitschr. f. ph. Ch.* 62. 86. 1909. — Schittenhelm und Seisser, *Zeitschr. f. exp. Path. u. Th.* 7. 116. 1909. — Mendel, Underhill und White, *Am. Journ. of ph.* 8. 377. 1903.

Diese Fermente sind bei den einzelnen Säugetieren auf die verschiedenen Organe in verschiedener Weise verteilt (vgl. die unter Benützung von Schittenhelms Zusammenstellung in Oppenheimers

		Guanase	Adenase	Xanthin-Oxydase	Urikooxydase
Leber	Mensch	+	—	+	—
	Rind	+	+	+	+
	Schwein	Guanosin-desamidase +	+	+	+
	Hund	+	Adenosin-desamidase +	—	+
	Kaninchen	+	—	+	+
Muskel	Mensch	+	—	—	—
	Rind	+	+	+	+
	Schwein	+	+	—	—
	Hund	+	—	—	—
	Kaninchen				
Niere	Mensch	+	+	—	—
	Rind	+	+	+	+
	Schwein	+		—	—
	Hund			—	—
	Kaninchen				—
Darm	Mensch	+	+	+	—
	Rind	+	+	+	—
	Schwein	+	+	—	—
	Hund	+	—	+	—
	Kaninchen				
Milz	Mensch	+	—	—	—
	Rind	+	+	+	—
	Schwein	—	+	—	—
	Hund	+	+	+	—
	Kaninchen				
Lunge	Mensch	+	+	—	—
	Rind	+	+	+	—
	Schwein	+	+	+	—
	Hund	+	+	+	—
	Kaninchen	+			—
Thymus	Rind	+	+	+	
Pankreas	Rind	+	+	+	
	Schwein	Guanosin-desamidase +	Adenosin-desamidase +		
	Hund	—	—	—	—

Handbuch der Biochemie angefertigte Tabelle S. 927<sup>1)</sup>) und entstehen wahrscheinlich, indem sie damit ihre Individualität beweisen, in verschiedener Reihenfolge im Verlaufe der embryonalen Entwicklung<sup>2)</sup>.

Hierzu ist zu bemerken, dass der Adenasegehalt der menschlichen Organe unsicher ist; nach Jones enthalten die Organe des Menschen überhaupt keine Adenase.

Mit der Gruppierung der Purine im Harn der Säugetiere steht in bestem Einklange, dass Harnsäureoxydase in irgend einem Organe jedes der untersuchten Tiere vorhanden ist, während in keinem Organe des Menschen Uricooxydase gefunden werden konnte<sup>3)</sup>. Dagegen scheint das Fehlen der Adenase zunächst dem Verständnisse Schwierigkeiten zu bereiten, denn im Harn wird kein Adenin ausgeschieden, wiewohl es in den Nucleinsäuren des Organismus reichlich vorhanden ist. Dieses Verhalten ist durch die Entdeckung der Adenosindesamidase (Jones) erklärlich geworden. Es ist anzunehmen, dass dieses inosinbildende Ferment auch in menschlichen Organen vorhanden ist.

Schliesslich entspricht das Schicksal der von aussen in den Organismus eingeführten freien Purine (soweit untersucht) vollständig den aus der Verteilung der endogenen Harnpurine für den intermediären Stoffwechsel gezogenen Schlüssen. Von den diesbezüglichen Versuchen sind diejenigen besonders wichtig, welche das Schicksal subkutan oder intravenös eingespritzter Harnsäure betreffen. Beim Menschen wird danach die eingeführte Harnsäure unverändert, beim übrigen Säugetier dagegen das Allantoin ausgeschieden<sup>4)</sup>. Schon früher wurde festgestellt, dass nach Injektion von freien Purinen beim Tier keine Harn-

<sup>1)</sup> Horbaczewski, Monatsh. f. h. 10. 624. 1889; 12. 221. 1891. — Chassevant et Richet, C. r. soc. biol. 48. 743. 1896. — Jakoby, Virch. Arch. 157. 235. 1899. — Spitzer, Pflügers Arch. 76. 192. 1899. — H. Wiener, Arch. f. exp. Path. u. Pharm. 42. 375. 1899. — Burian, Zeitschr. f. ph. Ch. 43. 497. 1904/05. — Schittenhelm, Zeitschr. f. ph. Ch. 46. 354. 1905; 45. 121. 1905. — Schittenhelm u. Schmid, ebenda, 50. 30. 1906/07; Zeitschr. f. exp. Path. u. Th. 4. 424. 1907. — Schittenhelm u. Künzel, Zentralbl. f. d. ges. Phys. u. Path. d. Stoffw. 1908. Nr. 19. 721. — Schittenhelm, ebenda, 4. 801. 1909; Zeitschr. f. ph. Ch. 63. 248. 1909. — Jones u. Partridge, Zeitschr. f. ph. Ch. 42. 343. 1904. — Jones, ebenda 45. 84. 1905. — Jones u. Austrian, ebenda, 48. 110. 1906. — Jones u. Winternitz, ebenda, 60. 180. 1909; 44. 1. 1905. — Jones u. Müller, ebenda, 61. 395. 1909. — Wiechowski, Arch. f. exp. Path. u. Pharm. 60. 185. 1909. — Wiechowski u. Wiener, Hofmeisters Beitr. z. ch. Phys. u. Path. 9. 247. 1907. — Battelli u. Stern, Biochem. Zeitschr. 19. 219. 1909. — Amberg u. Jones, Zeitschr. f. ph. Ch. 73. 407. 1911. — Jones, Journ. of biol. Ch. 9. 169. 1911.

<sup>2)</sup> Mendel u. Mitchel, ebenda, 20. 97. 1907. — Jones and Austrian, Journ. of biol. Ch. 3. 227. 1907.

<sup>3)</sup> Wiechowski, Arch. f. exp. Path. u. Pharm. 60. 197. 1909. Hier auch die Kritik der abweichenden Versuche von Croftan, Pfeiffer und Schittenhelm, worüber im Kapitel Harnsäure näheres zu finden ist, vgl. auch Schittenhelm, Zeitschr. f. ph. Ch. 63. 248. 1909.

<sup>4)</sup> Wiechowski, l. c. und Hofmeisters Beitr. z. ch. Ph. u. Path. 11. 109. 1907. — Mendel u. White, Am. Journ. of phys. 12. 85. 1904.

säure ausgeschieden wird<sup>1)</sup>. Das merkwürdige Verhalten des Adenins hierbei, welches sich als schweres Gift erwies und zur Ausscheidung eines sonst im Organismus nicht beobachteten Purinstoffes (6-Amino-2-8-Dioxypurin) Veranlassung gibt<sup>2)</sup>, kann dadurch erklärt werden, dass im Organismus freies Adenin überhaupt in der Norm nicht auftritt, indem aus der Nucleinsäure zunächst Adenosin, aus diesem nach Desaminierung Inosin und aus diesem Hypoxanthin gebildet wird.

Die Bestimmung des Verhältnisses der Glieder der Gesamt-Purinausscheidung gestattet also unmittelbar einen Schluss auf die Besonderheit des Purinstoffwechsels in einem vorliegenden Falle zu ziehen. Hiernach müsste man für jene Säugetiere (s. o.), bei denen sich der neben dem Allantoin verbleibende Purinrest derart verteilt, dass überwiegend Basen und weniger Harnsäure ausgeschieden wird, annehmen, dass Allantoin entweder direkt, ohne die Harnsäurestufe zu passieren, aus den Basen entstehen kann, oder dass die Oxydation zu Harnsäure langsamer erfolgt als die Oxydation der Harnsäure zu Allantoin.

Die spezifische Relation zwischen den Gliedern der Purinausscheidung schwankt bei den verschiedenen Säugetierarten individuell nur sehr wenig. Insbesondere wird das Verhältnis Gesamt-Purin-N zu Harnsäure-N beim Menschen und das Verhältnis Gesamt-Purin-N zu Allantoin-N bei den übrigen Säugetieren mit grosser Zähigkeit festgehalten. Ich habe mich davon überzeugt, dass wenigstens, soweit die endogene Ausscheidung in Betracht kommt, es kaum gelingt, durch Vergiftung oder sonstige Massnahmen beim Kaninchen und Hund eine Oxydationshemmung im Sinne einer vermehrten Harnsäureausscheidung und verminderten Allantoinausscheidung zu erzielen (Blausäure, Narkose, Blei, Schilddrüsenexstirpation<sup>3)</sup>). Mendel und White geben an, dass Sulfonal und Chinin-Vergiftung die Allantoinbildung aus injizierter Harnsäure verhindere, sie haben aber mit einer unzulänglichen Allantoinbestimmungsmethode gearbeitet, so dass die Frage noch als unbeantwortet gelten muss<sup>4)</sup>. Bei lang dauernder Nucleinsäurefütterung sah Hirokawa beim Hunde das Verhältnis sich zugunsten der Harnsäure verschieben<sup>5)</sup>. Im selben Sinne spricht eine Beobachtung von mir und Wiener. Nach langdauernder ausschliesslicher Fütterung mit Kalbsbries zeigte die Leber eines Hundes einen auffallend geringen Gehalt an Harnsäureoxydase<sup>6)</sup>.

Diuresesteigerung soll beim Hunde zu einer vermehrten Harnsäure-

<sup>1)</sup> Schittenhelm, Arch. f. exp. Path. u. Pharm. **47**. 432. — Schittenhelm u. Bendix, Zeitschr. f. ph. Ch. **42**. 461. 1904.

<sup>2)</sup> Minkowski, Arch. f. exp. Path. u. Pharm. **42**. 375. 1898; Deutsche med. Wochenschr. **28**. 499. 1902. — A. Nicolaier, Zeitschr. f. klin. Med. **45**. 359. 1902. — Krüger, Münch. med. Wochenschr. 1903. 741.

<sup>3)</sup> Unveröffentlicht.

<sup>4)</sup> Am. Journ. of ph. **12**. 85. 1904.

<sup>5)</sup> Biochem. Zeitschr. **26**. 441. 1900.

<sup>6)</sup> Unveröffentlicht.



ausfuhr Veranlassung geben, im Gegensatz zum Menschen<sup>1)</sup>; die Gesamt-Purinausscheidung der Kaninchen ist bei der Steigerung der Diurese wenigstens für die Tagesmenge nicht vermehrt<sup>2)</sup>; es könnte sich daher bei der Beobachtung von Burian und Schur um durch die Diurese bewirkte beschleunigte Ausscheidung intermediärer Produkte (das ist die Harnsäure beim Hunde) handeln.

Beim Menschen ist das Verhältnis Harnsäure-N zu Basen-N (besser wäre es, das Verhältnis Gesamt-Purin-N zu Harnsäure-N anzugeben) durchschnittlich 10:1. Es schwankt bei Gesunden zwischen 6:1 und 14:1 und ist beim einzelnen ziemlich konstant. Bei der Gicht hat es die Tendenz niedrig zu liegen, es scheinen also die Basen leichter ausgeschieden zu werden als die Harnsäure<sup>3)</sup>. Rotky fand bei Nephritis, Diabetes und Polyurie weit mehr Basen als Harnsäure<sup>4)</sup>. Der Befund bei Polyurie lässt sich im obigen Sinne (vermehrte Ausscheidung intermediärer Produkte) deuten. Zur Beurteilung der Befunde bei Gicht, Nephritis und Diabetes wird man in Betracht ziehen müssen, dass die Harnsäure wegen ihrer Schwerlöslichkeit wohl auch am schwersten von allen Purinen ausgeschieden wird. Die Verschiebung des Verhältnisses kann daher durch Retention der Harnsäure bedingt sein, ohne dass eine Stoffwechselstörung vorliegen müsste. — Bei der Vermehrung der Gesamt-Purinausscheidung durch Muskeltätigkeit sind die Basen im Anfang mehr gesteigert als die Harnsäure<sup>5)</sup>.

Einer besonderen Besprechung bedarf noch das Verhalten der methylierten Xanthine. Zunächst ist hervorzuheben, dass sie im Säugetierorganismus nicht entstehen und ihr Auftreten im Harn lediglich mit der Aufnahme in der Nahrung zusammenhängt. In den sie enthaltenden Genussmitteln kommen sie, so weit bekannt, nur in freiem Zustande vor. Doch beobachteten Salomon und Neuberg<sup>6)</sup> in 25 Liter normalen Harns eines Hundes, der ausschliesslich mit Fleisch gefüttert war, und also keine Methylpurine zu sich genommen haben sollte, das Vorhandensein von Heteroxanthin. Ferner ist bemerkenswert, dass zum Unterschied von den Amino- und Oxy-purinen die Methylpurine im allgemeinen nicht zu einer Harnsäuresteigerung beim Menschen bzw. einer vermehrten Allantoinausscheidung bei den übrigen Säugetieren Veranlassung geben. Doch gilt auch dieser Satz nicht unbedingt. Eine geringfügige Steigerung von Harnsäure bzw. Allantoin wurde doch konstatiert<sup>7)</sup>.

Das Wesentliche des Schicksals der Methylxanthine ist eine stufenweise Entmethylierung, die schliesslich zu einem Monomethylxanthin führt. Es entstehen alle theoretisch möglichen Monomethylxanthine.

<sup>1)</sup> Burian u. Schur, Pflügers Arch., 1. c.

<sup>2)</sup> Unveröffentlicht.

<sup>3)</sup> Brugsch u. Schittenhelm, Zeitschr. f. exp. Path. u. Th. 4. 517. 1907.

<sup>4)</sup> Deutsch. Arch. f. klin. Med. 98. 540. 1910.

<sup>5)</sup> Burian, Zeitschr. f. ph. Ch. 43. 532. 1904.

<sup>6)</sup> Salkowski - Festschrift, 37.

<sup>7)</sup> Krüger u. Schmid, Zeitschr. f. ph. Ch. 32. 104. — Schittenhelm, Therap. Monatsh. 1910. 113. — Valenti, Arch. ital. de biol. 53. 86. 1911.

Bei den einzelnen Säugetierarten erweist sich aber die Methylgruppe einer bestimmten Stellung immer besonders bevorzugt. Die Monomethylxanthine werden nur sehr schwer abgebaut.

Nach Kaffein- (1-3-7-Trimethylxanthin-) Zufuhr werden ausgeschieden <sup>1)</sup> beim Hunde: Kaffein, 3-7-Dimethylxanthin (Theobromin), 1-3-Dimethylxanthin (Theophyllin), 1-7-Dimethylxanthin (Paraxanthin) und 3-Monomethylxanthin. Am meisten wird Theophyllin ausgeschieden. Der Abbau greift an allen drei Methylgruppen an, am wenigsten widerstandsfähig erweist sich die 7-Methylgruppe. — Beim Kaninchen: viel Theobromin, daneben Theophyllin, Paraxanthin und 7-Monomethylxanthin. Hier ist also die 3-Methylgruppe am wenigsten widerstandsfähig; beim Menschen: am meisten Theophyllin, aber auch 7- und 1-Monomethylxanthin. Beim Vogel geht Kaffein zu rund 10% in Harnsäure über <sup>2)</sup>).

Nach Theobromin (3-7-Dimethylxanthin) <sup>3)</sup> werden von Hund und Kaninchen beide Monomethylxanthine: 3-Methylxanthin und Heteroxanthin (7-Methylxanthin) ausgeschieden. Das Kaninchen scheidet mehr Heteroxanthin aus, der Hund mehr 3-Methylxanthin. Auch der Mensch scheidet nach Theobromineinnahme Heteroxanthin aus.

Nach Theophyllin(1-3-Dimethylxanthin)eingabe scheidet der Hund 3-Methylxanthin aus <sup>4)</sup>).

Nach Paraxanthin(1-7-Dimethylxanthin)fütterung erscheint im Harn des Kaninchens 1-Methylxanthin <sup>5)</sup>, nach 8-Dimethylamino-Paraxanthin beim Menschen 8-Dimethylamino-Heteroxanthin <sup>6)</sup>.

Das 3-Methylxanthin wird vom Kaninchen zu einem Teil unverändert ausgeschieden <sup>7)</sup>).

An der Entmethylierung und dem totalen Abbau — zum Unterschiede von den körpereigenen Purinen scheinen die Methylxanthine zum Teil einer völligen Zerstörung im Säugetierorganismus zu unterliegen — sind beteiligt: Blut, Leber, Niere, Milz, Lunge und Muskel <sup>8)</sup>).

II. Allgemeine Eigenschaften. Die konstitutiven Beziehungen der Purinstoffe und des Allantoins untereinander sind oben gegeben worden, sowie auch das damit in Übereinstimmung stehende Schicksal der Purine im Säugetier: einerseits Desaminierung und sukzessive Oxydation über Harnsäure zu Allantoin, andererseits sukzessive Entmethylierung bis zum Xanthin. Entsprechend der konstitutiven Ver-

<sup>1)</sup> Albanese, B.B. **32**. 2280. — Krüger, B.B. **32**. 2818. 3336; **33**. 3665.

<sup>2)</sup> Valentini, Boll. soc. med. chir. di Pavia. Febr. 1900.

<sup>3)</sup> Krüger u. Schmid, B.B. **32**. 2677; Zeitschr. f. ph. Ch. **36**. 1. 1902; Arch. f. exp. Path. u. Pharm. **45**. 259. 1901. — Schmid, Dissert. Berlin 1904.

<sup>4)</sup> Gottlieb u. Bondzynski, nach J. T. **25**. 90.

<sup>5)</sup> Schmid, Dissert. Berlin 1904.

<sup>6)</sup> Forschbach und Weber, Arch. f. exp. Path. u. Pharm. **56**. 186. 1907.

<sup>7)</sup> Krüger und Schmid, B. B. **32**. 2677. — Schmid, Dissert. Berlin 1904.

<sup>8)</sup> Schmid, Zeitschr. f. ph. Ch. **67**. 155. 1910. — A. Valentini, Boll. d. soc. med. chir. Pavia, 1909, Juli. — Albanese, Arch. di farm. e sc. aff. 1903. 352.

wandtschaft haben die Purine eine Reihe von Eigenschaften gemeinsam, die im folgenden angegeben sind. Das Allantoin dagegen, welches in physiologischer Beziehung die nächsten Beziehungen zu den Purinstoffen hat, verhält sich in chemischer Beziehung — da es ja auch infolge Sprengung des Pyrimidinringes nicht mehr den charakteristischen geschlossenen 9gliedrigen Purinkomplex aufweist — ganz anders. Seine Reaktionen weisen ihm eher einen Platz neben dem Harnstoff an. Es ist von der folgenden allgemeinen Übersicht über die Eigenschaften der Purinstoffe ausgeschlossen.

1. Die Synthese der Purinstoffe wurde auf zwei Wegen erreicht. Emil Fischer geht vom Trichlorpurin aus (s. o. S. 905), welches sich einerseits weitgehend methylieren lässt und andererseits die Chloratome gegen  $\text{NH}_2$ , OH und H-Gruppen auszutauschen imstande ist. W. Traube geht vom Cyanacetyl-Harnstoff von Mulder aus, bzw. von den analog aus Thio- oder Imido-Harnstoff (Guanidin), Cyanessigester und Phosphoroxychlorid erhaltenen Verbindungen, welche beim Stehen mit Alkalien in 4-Aminopyrimidine übergehen. Die hierauf mit Salpetrigsäure erhaltenen Isonitroso-Derivate geben reduziert die entsprechenden 4-5-Diaminopyrimidine. Aus letzteren wird mit Ameisensäure eine Formylverbindung in Stellung 5 erhalten, welche bei  $220^\circ$  Wasser abgibt und in das betreffende Purin übergeht.

2. Die freien Purinstoffe sind mit Ausnahme der Harnsäure nicht eben leicht krystallisierbar.

Amorph werden erhalten das Hypoxanthin und bei gewöhnlicher Darstellung auch das Xanthin und das Guanin; aber gerade die letztgenannten zwei Basen können sich unter bestimmten Bedingungen in charakteristischen Formen abscheiden.

Das Hypoxanthin bildet hautartige Massen kleiner, mit scharfen Ecken versehener Körnchen, welche für diese Basis eigentümlich sind. Aus heisser, stark verdünnter Lösung scheidet sich das Xanthin aus in makroskopischen lockeren Drusen grosser, dünner glänzender, rhombischer Platten, oder einzelnen rhombischen, der Harnsäure ähnlichen Tafeln, das Guanin aus stark verdünnten heissen Lösungen in schwachem Alkohol in dichten kugeligen oder fächerförmigen Drusen prismatischer oder pyramidaler Krystalle; das Paraxanthin krystallisiert in sechsseitigen Tafeln und aus heisser, konzentrierter Lösung in wasserfreien, prismatischen Nadeln. Das Heteroxanthin bildet Nadeln oder Prismen, die in Drusen oder Fächern angeordnet sein können; aus Ammoniak scheidet es sich in Form gleichseitiger sphärischer Dreiecke ab. Das Adenin bildet lange Nadeln oder mikroskopische lange platte sechsseitige Prismen, die zu Büscheln angeordnet sein können, oder gestreckte Pyramiden (Wetzsteine); sie trüben sich unter Verlust ihres Krystallwassers an der Luft schnell bei  $53^\circ$ . Das Epiguanin ist in feinen, langen Nadeln erhalten worden. — Selbstverständlich können die krystallisierenden Basen, namentlich in unreinem Zustand, amorph (in Knollen usw.) auftreten.

Der Schmelzpunkt der Purine steigt mit steigendem O-Gehalte, bzw. es nimmt die Schmelzbarkeit in der gleichen Reihe ab, wogegen



der Eintritt von  $\text{CH}_3$ -Gruppen den Schmelzpunkt erniedrigt. Die meisten Purine haben überhaupt keinen Schmelzpunkt. Die Sublimierbarkeit nimmt mit steigendem Gehalt an  $\text{CH}_3$  zu.

3. Die Löslichkeit in Wasser nimmt mit steigendem Gehalt an  $\text{O}_2$  ab und steigt mit dem Gehalte an  $\text{CH}_3$ .

Von den Lösungen einiger Basen ist ermittelt, dass sie gegen Lackmus neutral reagieren.

Unlöslich ist das Guanin, sehr schwer löslich das Epiguanin. Das Xanthin löst sich in 13 000 Teilen, das Hypoxanthin in 1880, das Adenin in 1086 Teilen Wasser. Durch Sättigen ihrer Lösungen mit Ammonsulfat werden nach Edmunds Xanthin und Hypoxanthin nicht gefällt, durch Sättigen mit Chlorammon wird nach Hopkins <sup>1)</sup> das Xanthin gefällt, das Hypoxanthin nicht.

4. Die Purine sind mit Ausnahme der Harnsäure amphotere Elektrolyte. Sie bilden sowohl H- als OH-Ionen. Als schwache Säuren und Basen sind ihre Salze stark hydrolytisch dissoziiert, und eine reichliche Bildung von negativen Purin-Ionen ist nur möglich, wenn durch einen grossen Laugenüberschuss die Dissoziation des Wassers und damit die Hydrolyse zurückgedrängt wird. Ebenso verhält es sich mit den Säureverbindungen der Purine. Hier kommt die Bildung der positiven Ionen wahrscheinlich wie beim Ammoniak durch Anlagerung von Wasser zustande. Die Abspaltung von OH-Ionen bleibt aber gering, so dass die positiven Purin-Ionen nur bei grossem Säureüberschuss, welcher die Dissoziation des Wassers und damit die Hydrolyse zurückdrängt, beständig sind <sup>2)</sup>.

5. Die Ultraviolett-Absorption der Purine verschiebt sich mit zunehmendem O- und  $\text{CH}_3$ -Gehalt nach dem weniger brechbaren Teil des Spektrums <sup>3)</sup>.

6. In den Alkalihydraten lösen sich alle Basen leicht, in Ammoniak nur einige; die Verbindungen mit den übrigen Metallen sind schwer löslich oder unlöslich.

a) In Ammoniak löst sich das Guanin fast gar nicht, das Epiguanin sehr schwer. Das Guanin und Epiguanin werden aus ihren sauren Lösungen beim Übersättigen mit Ammoniak gefällt; aus ihren Lösungen in Alkalihydrat fallen auf Zusatz von Salmiak nachweislich die Homologen des Xanthins und das Guanin, die anderen wahrscheinlich auch im umgekehrten Verhältnis zu ihrer Löslichkeit in Ammoniak (das Xanthin nicht).

b) In konzentrierter (30 %iger) Natron- (oder Kali-) lauge sind allein unlöslich die drei Homologen des Xanthins und das Epiguanin. Die Lösungen in den Alkalihydraten reagieren alkalisch, werden durch Kohlensäure gefällt (schon beim Stehen an der Luft) und scheiden dabei entweder ein Salz der Basis ab (wie das Xanthin) oder, wenn das Alkali in Bicarbonat übergeführt ist, die freie Basis. Durch Essigsäure, durch saure Salze, oder beim Neutralisieren mit

<sup>1)</sup> A. Edmunds, Journ. of Physiol. 17. 452. 1895. — F. G. Hopkins, Journ. of Pathol. and Bacteriol. 1893. 452.

<sup>2)</sup> G. Bredig, Zeitschr. f. Elektroch. 6. 33. 1899. — Über die Affinitätskonstanten des Xanthins und seiner Derivate vgl. J. Kerfoot Wood, Proc. ch. soc. 2. 271. 1907; Journ. ch. soc. London 87. 1839.

<sup>3)</sup> Ch. Dhère, C. r. acad. des sc. 142. 719. 1906; C. r. soc. biol. 50. 33. 1906.



einer Mineralsäure werden die Basen mehr oder minder vollständig gefällt. Fällung aus alkalischer Lösung durch Salmiak 6. a.:

7. Von den krystallisierenden Barytsalzen (vakuumtrocken  $X \cdot Ba(OH)_2$ ) löst sich das Xanthinsalz nur wenig in kochendem Wasser, das Guaninsalz nicht unbedeutend, das des Hypoxanthins leichter als das reine Hypoxanthin in Wasser (Strecker). Das Adenin gibt mit Barytwasser einen Niederschlag (Kossel).

8. Durch Bleiessig und Ammoniak werden alle Xanthinbasen und die Harnsäure, mit Ausnahme des Epiguanins, gefällt (Balke, Krüger). Mit Bleiessig allein gibt auch das Hypoxanthin Niederschläge, jedoch nur in Abwesenheit von Bleizucker (Weidel<sup>1)</sup>). Vom Xanthin, Hypoxanthin und Adenin ist bekannt, dass sie aus ihren Lösungen in 2 Mol. Natriumhydrat durch Bleizucker abgeschieden werden. Auch das Adenin wird durch Bleiacetat und Ammoniak nicht niedergeschlagen<sup>2)</sup>.

9. Essigsäures Kupfer fällt die meisten der Basen, das Hypoxanthin schon in der Kälte. Die Niederschläge sind hellgrün oder bräunlich.

10. Mit Kupferoxydul gehen alle Basen, wie die Harnsäure, unlösliche Verbindungen ein. Drechsel stellte zuerst die Verbindungen von Xanthin, Guanin und Hypoxanthin dar durch Zusatz einer ammoniakalischen Kupferchlorürlösung zur Lösung der Basen, oder durch Erwärmen der Basis in Fehlingscher Lösung mit Traubenzucker oder durch Versetzen einer Lösung der Basis in Fehlingscher Lösung mit Hydroxylaminsalz. Balke fügte diesen das Heteroxanthin, Paraxanthin und Adenin hinzu. Krüger<sup>3)</sup> zeigte dann, dass sich die Verbindungen auch darstellen lassen mittelst Kupfersulfat und Bisulfit oder Thiosulfat; mittelst Bisulfit beginnt die Fällung beim Guanin, Hypoxanthin und Adenin schon in der Kälte und verläuft schnell in der Wärme; bei Verwendung von Thiosulfat als Reduktionsmittel wird das Hypoxanthin in der Kälte nicht gefällt, wohl aber in der Wärme; Guanin und Adenin verhalten sich wie bei der Fällung mit Bisulfit. Nur Guanin und Adenin geben in kalter wässriger Lösung ihrer Salze mit Kupfersulfat und Thiosulfat Niederschläge. Heteroxanthin, 1-Methylxanthin und Epiguanin werden, wie die anderen Xanthinbasen, durch Kupfersulfat und Bisulfit schon in der Kälte gefällt (Krüger und Salomon, l. c.). Die Verbindungen sind flockig oder gallertig und weiss, werden aber an der Luft bald grün und braun, sind in Wasser so gut wie unlöslich, lösen sich aber in Thiosulfat, in Mineralsäuren, namentlich leicht in Salpetersäure, langsam in heisser Essigsäure und bei Zutritt von Luft in Ammoniak, wenn ihre Basis in Ammoniak löslich ist. Die Hydrate der fixen Alkalien lösen sie nicht, Alkalisulfid zersetzt sie. Kupfersulfat und Bisulfit fällen alle Purine (mit Ausnahme von Caffein und Theobromin), auch bei Gegenwart von 2 % Kochsalz eventuell mit 6 % Natriumacetat. Das Kochsalz hemmt die Fällung des Paraxanthins, daher muss mindestens 3 Minuten gekocht werden, damit die Fällung vollständig verläuft<sup>4)</sup>. Die Fällungen werden durch Nucleinsäure gehemmt<sup>5)</sup>.

11. Verbindungen mit Silberoxyd. Wie die Harnsäure werden alle Xanthinbasen durch ammoniakalische-Silberlösung gefällt. Die Niederschläge sind nach dem Typus  $X \cdot Ag_2O$  zusammengesetzt, gallertig oder flockig, in Wasser schwer löslich, in Ammoniak nicht ganz unlöslich.

Von den Niederschlägen ist der des Xanthins in  $NH_3$  in geringem Grade, der des Guanins, Hypoxanthins, Adenins in verdünntem Ammoniak sehr schwer,

<sup>1)</sup> Balke, Journ. f. prakt. Ch. [2] 47. 566. — M. Krüger, Du Bois' Arch. 1894. 533. — Weidel, Ann. d. Ch. u. Pharm. 158. 362 u. 358. 1871.

<sup>2)</sup> Krüger und Salomon, Zeitschr. f. ph. Ch. 24. 370, 339, 394. 1898.

<sup>3)</sup> E. Drechsel, Ber. d. chem. Gesellsch. 25. 2454. 1892. — Balke, a. a. O. — M. Krüger, Zeitschr. f. physiol. Ch. 18. 352.

<sup>4)</sup> M. Krüger, und J. Schmid, Zeitschr. f. phys. Ch. 45. 1. 1905.

<sup>5)</sup> P. Shiga, Zeitschr. f. phys. Ch. 42. 502. 1904.

der des Adenins in starkem Ammoniak beträchtlich, der des Hypoxanthins auch da schwer löslich. Diese Niederschläge lösen sich, soweit sie geprüft sind, auch in Thiosulfatlösung (Kossel und Krüger<sup>1)</sup>). Der Hypoxanthinniederschlag wird bei der Digestion mit Ammoniak krystallinisch. — Ausser der Verbindung von der angegebenen Zusammensetzung wird von dem Adenin (gleichzeitig) auch eine Verbindung  $C_5H_4AgN_5$  erhalten. Sehr empfindlich ist die Fällung des Paraxanthins gegen Ammoniaküberschuss. Es scheint, dass manche Stoffe die Löslichkeit der Silberverbindungen in Ammoniak sehr erhöhen können. Gelegentlich erhält man bei dem Ammoniakgehalte, der mässige Mengen von Chlorsilber (bei Kochsalzanwesenheit) gerade in Lösung erhält, keine Purinfällung. Die Verbindungen fallen aber beim weiteren Versetzen mit Silbernitratlösung kurz vor oder auch gleichzeitig mit Chlorsilber aus. In solchen Fällen empfiehlt es sich zur Sicherheit etwas Chlorsilber durch entsprechenden Silbernitratzusatz zu der ammoniakalischen Flüssigkeit mit auszufällen und erst nach dem Zersetzen des Niederschlages und eventueller Abtrennung der Harnsäure die Basen noch einmal, nun aber nur mit ammoniakalischer Silberlösung, die keinen Ammoniaküberschuss enthält, zu fällen (Bass, unveröffentlicht). Die Fällung der Purine durch ammoniakalische Silberlösung wird durch Albumosen gehemmt.

12. In Mineralsäuren lösen sich die Xanthinbasen mehr oder minder leicht und bilden mit ihnen krystallisierende Salze, von denen die meisten durch Wasser allein zersetzt werden. Wie die neutralen Salze des Hypoxanthins und des Adenins werden auch die der übrigen Basen gegen Lackmus sauer reagieren. Hypoxanthin und Adenin lösen sich leicht in Salzsäure, Xanthin und Guanin schwer. Organische Säure (Essigsäure) löst sie schwer oder nicht. Die Verbindungen des Xanthins und seiner Homologen mit Salzsäure, Salpetersäure oder Schwefelsäure werden durch Wasser vollständig zersetzt.

a) Das Chlorid des Xanthins bildet kuglige Aggregate oder Oktaeder. Das des Paraxanthins krystallisiert sehr schwer, die Chloride aller anderen Basen bilden Prismen (das des Hypoxanthins auch Tafeln), die Krystalle des Heteroxanthins und Guanins sind makroskopisch.

b) Chloroplatinate. Das des Xanthins (gelbe Nadeln) und Heteroxanthins leicht löslich, prismatisch (das des Epiguanins sechsseitige orangefarbene Prismen, charakteristisch).

c) Chloraurate. Vom Guanin nicht darstellbar, das des Adenins und Epiguanins schwer lösliche Nadeln oder Prismen.

d) Nitrate. Epiguanin kleine polyedrische Krystalle, Guanin feine Nadeln und sechsseitige Tafeln, Adenin Sterne, Xanthin gewimperte Kugeln.

e) Sulfate. Adenin schwer lösliche wohl ausgebildete Krystalle, Xanthin perlgänzende rhombische Tafeln oder Nadelbüschel, Hypoxanthin Nadeln, Guanin makroskopische Prismen.

f) Pyrochromate. Guanin und Epiguanin bilden orangefarbene, schwer lösliche Prismen, Adenin goldgelbe sechsseitige Tafeln. Xanthin und Hypoxanthin geben keinen Niederschlag.

g) Metaphosphate. Von den untersuchten Basen geben nur Adenin und Guanin äusserst feinkörnige, flockige oder häutige Niederschläge. Beide Salze lösen sich schwer in Wasser. Die Adeninverbindung ist löslich in überschüssiger Metaphosphorsäure, beide in Mineralsäure und in Alkalihydrat, die Adeninverbindung leicht auch in Ammoniak.

h) In saurer Lösung werden alle Xanthinbasen durch Phosphorwolframsäure gefällt (Hirschler<sup>2)</sup>, Salomon); das Epiguanin

<sup>1)</sup> Zeitschr. f. ph. Ch. 18. 356. 1893.

<sup>2)</sup> Hirschler, Zeitschr. f. physiol. Ch. 11. 25. 1887.

ist in dieser Richtung nicht untersucht. Wegen der Schwerlöslichkeit ihrer Verbindungen in Mineralsäuren darf die Phosphorwolframsäure als empfindliches Gruppenreagens betrachtet werden und eignet sich die Fällung der Basen durch diese Säure vorzüglich zur Darstellung selbst kleiner Mengen der Basen. Die Fällung ist nicht absolut vollständig und zum Teil in Wasser löslich<sup>1)</sup>. In sehr starker Verdünnung werden die Purinstoffe jedoch von sehr verdünnter Phosphorwolframsäure nicht gefällt, namentlich wenn der Zusatz von Mineralsäure ebenfalls gering ist (0,5% Schwefelsäure und weniger), wenn leichter fällbare Stoffe (Albumosen, Eiweiss, Alkaloide) zugegen sind, wenn man einen Überschuss von Phosphorwolframsäure vermeidet, d. h. das Filtrat einer Fällung keine Phosphorwolframsäure in nachweisbarer Menge enthält und man allenfalls bei mässiger Wärme arbeitet (Wiechowski und Bass, unveröffentlicht).

i) Pikrate. Die Pikrinsäure gibt mit den freien Basen oder Natriumpikrat mit der Verbindung der Basis mit einer Säure in Nadeln krystallisierende Verbindungen mit Paraxanthin, Guanin, Hypoxanthin, Adenin, Epiguanin. Dem Natriumpikrat wird unter Umständen das noch weit löslichere Magnesumpikrat vorzuziehen sein.

Das Paraxanthin bildet verfilzte gelbe unbeständige Flitter, alle anderen Nadeln oder Prismen. Das Pikrat des Hypoxanthins und des Adenins sind ausgezeichnet durch ihre hellgelbe Farbe. Von den näher untersuchten Verbindungen scheiden sich die des Guanins und des Hypoxanthins langsam ab; diese und das Adeninpikrat sind sehr schwer löslich in kaltem Wasser, das Adeninpikrat besonders schwer löslich in einer Natriumpikratlösung. Die Pikrate werden durch die Alkalihydrate und -carbonate zersetzt (gelöst) und sind nur in neutraler oder schwach saurer Flüssigkeit beständig. Adeninpikrat löst sich leicht in einfach saurem Natriumphosphat. Die Purinstoffe lassen sich aus den Pikraten durch Lösen in Säuren und Ausäthern der Pikrinsäure gewinnen. Zweckmässig ist es, das umständliche Extrahieren der Pikrinsäure dadurch zu verkürzen, dass man die in der Hitze gelösten Pikrate mit ammoniakalischer Silberlösung fällt. In die Fällung der Purine geht dabei nur wenig Pikrinsäure ein, die sich nach dem Zersetzen der Niederschläge, z. B. durch Salzsäure leicht ausziehen lässt (Jones<sup>2)</sup>).

j) Picrolonate. Mit alkoholischer Picrolonsäurelösung fällt Adenin, aus dem Filtrat durch Natronlauge das Guanin<sup>3)</sup>.

k) Mit Ferricyankalium gibt (salzsaures) Guanin schwer lösliche vier- und sechsseitige gelbbraune Prismen, das Adenin, Xanthin und Hypoxanthin direkt keine Niederschläge.

l) Jodjodkalium gibt nach Kerner<sup>4)</sup> mit Guanin, Sarkin und Xanthin bei einer Verdünnung von 1:1000 grünlich braunrote Trübung oder Fällung.

13. Silberpikrate. Die Pikrate des Guanins, Hypoxanthins, und Adenins geben mit Silbernitrat ausserordentlich (selbst in heissem Wasser) schwer lösliche Niederschläge.

<sup>1)</sup> Burian und Hall, Zeitschr. f. ph. Ch. 38. 374. 1903.

<sup>2)</sup> Journ. of biol. Ch. 9, 93. 1911.

<sup>3)</sup> P. A. Levene, Biochem. Zeitschr. 4. 1907.

<sup>4)</sup> Kerner, a. a. O. 216.



Die Verbindungen des Guanins und des Adenins sind amorph, die des Hypoxanthins bildet kurze Nadeln.

14. Durch Quecksilberchlorid werden alle Xanthinbasen gefällt. Die Niederschläge sind, soweit untersucht, krystallisierbare Verbindungen der Basen mit Quecksilberchlorid.

Das Epiguanin fällt erst auf Zusatz von Natriumkarbonat. Eine stark verdünnte Epiguaninlösung bleibt mit wenig Quecksilberchlorid klar und gibt mit mehr Reagens auch nur eine Trübung, keinen flockigen Niederschlag (Krüger und Salomon, l. c.). Das Heteroxanthin gibt mit Quecksilberchlorid sogleich einen Niederschlag, das Paraxanthin wird dagegen nur langsam und erst auf Zusatz eines Überschusses von Reagens gefällt. Das Xanthin scheidet sich noch bei 30 000 facher Verdünnung ab (Aug. Stromeyer<sup>1</sup>). Auch die Harnsäure wird durch Sublimat gefällt. Das Hypoxanthin und das Adenin geben nur in Gegenwart von Salzsäure Niederschläge von der angegebenen Zusammensetzung, in Abwesenheit von solcher bestehen sie aus der Basis, in welcher 1 At. H durch die einwertige Gruppe -Hg-Cl ersetzt ist. Ein Teil der Basis (Adenin) bleibt in der frei werdenden Salzsäure in Lösung und wird erst durch Natriumcarbonat abgeschieden. — Die Sublimatverbindungen sind unbeständig. Auch Merkurinitrat, Merkuriazetat und Merkuronitrat fallen die Purine insbesondere dann vollständig, wenn die jeweils freiwerdende Säure neutralisiert wird.

15. Verbindungen mit Silbernitrat. Kocht man die Silberniederschläge (11.) mit (verdünnter) Salpetersäure, so gehen sie in Lösung und man erhält aus dieser die übrigens auch direkt aus ihren Bestandteilen darstellbaren Verbindungen der Basen mit Silbernitrat,  $X. AgNO_3$ , die alle gut krystallisieren und sich ausser durch die Krystallform noch durch ihre verschiedene Löslichkeit in verdünnter Salpetersäure unterscheiden. Man bedient sich dieser Unterschiede in der Löslichkeit nach dem Vorgang von Neubauer<sup>2</sup>) zur vorläufigen Trennung der Basen.

Von den Verbindungen lösen sich nur die des Xanthins und seiner Homologen leicht in heisser Salpetersäure von 1,1 Dichte und bleiben, wenn die Lösung nicht zu konzentriert ist, auch nach dem Erkalten in Lösung (Xanthinfraktion). Von den Verbindungen der anderen Basen ist die des Guanins kaum in Lösung zu bringen, die der übrigen Basen schwer und beim Erkalten scheidet sich die Basis in Verbindung mit Silbernitrat mehr oder minder vollständig wieder ab (Hypoxanthinfraktion). Gegenwart von Silbernitrat erschwert die Löslichkeit.

Die Verbindungen von Hypoxanthin und Adenin enthalten mehr Silber, als der Formel  $X. AgNO_3$  entspricht. Das Heteroxanthin bildet Tafeln und Prismen, das Paraxanthin makroskopische weisse Büschel, das Adenin millimeterlange Krystalle, Xanthin und Hypoxanthin Drusen von Nadeln.

Von den Verbindungen des Xanthins, Hypoxanthins und Adenins ist bekannt, dass sie beim Auswaschen mit Wasser Salpetersäure und Silber verlieren.

Durch Digestion mit ammoniakalischer Silberlösung oder durch Zusatz von Ammoniak zu der überschüssiges Silbernitrat enthaltenden Lösung in Salpetersäure kann die ursprüngliche Verbindung der Basen mit Silberoxyd wieder erhalten werden. Digeriert man die Verbindungen  $X. AgNO_3$  mit Ammoniak allein, so bildet die Hälfte der Basis mit dem vorhandenen Silber die Verbindung  $X. Ag_2O$ , und die andere Hälfte der Basis geht, wenn sie in Ammoniak löslich ist, in Lösung.

<sup>1</sup>) Aug. Stromeyer, Ann. d. Ch. u. Pharm. 134. 49. 1865.

<sup>2</sup>) Neubauer, Zeitschr. f. anal. Ch. 6. 33. 1867.



16. Die Purine können ihre H-Atome leicht gegen Alkyle, Cl. oder OH austauschen. Die Aminoderivate der Purine, welche eine freie  $\text{NH}_2$ -Gruppe enthalten, können ausserdem natürlich Acetyl- und Benzoylderivate bilden. Diejenigen Purine, welche im Imidazolring die Amidin-

bindung noch erhalten haben  $\left( \begin{array}{c} -\text{NH}(7) \\ -\text{N} \searrow \text{CH}(8) \end{array} \right)$ , d. h. bei denen das 8-C-

Atom nicht hydriert oder oxydiert ist und bei denen die Stellung 7 nicht substituiert ist, verbinden sich mit Diazokörpern zu Diazoamidverbindungen, gelben bis roten, krystallisierten, säurebeständigen, in Alkali löslichen Stoffen (Burian<sup>1)</sup>). Alkaliüberschuss wirkt bei der Bildung schädlich. Durch heisses Wasser oder heisse Lauge werden diese Verbindungen unter N-Entbindung zersetzt.

#### 17. Farbenreaktionen.

a) Die Weidelsche Probe. Es wird ein wenig Substanz in der Wärme in frischem Chlorwasser gelöst (der von Weidel empfohlene gleichzeitige Zusatz einer Spur Salpetersäure ist überflüssig), die Lösung im Wasserbade zur Trockne abgedampft und der weisse oder schwach gelbe Rückstand unter einer Glocke einer Ammoniakatmosphäre ausgesetzt. Xanthin (Kossel, Salomon) und seine Homologen (Salomon) werden dabei dunkelrosenrot oder purpurrot, auf Zusatz von Natron- oder Kalilauge (in der Wärme) blauviolett (Salomon<sup>2)</sup>).

Guanin (Krukenberg und Wagner, Salomon), Hypoxanthin (Scherer, Kossel, Salomon) und Adenin (Kossel<sup>3)</sup>) geben diese Probe nicht, ebensowenig Epiguanin. Dagegen gibt sie auch die Harnsäure.

Die Probe ist eine Murexidprobe (S. 1029). Erwärmt man nach E. Fischer<sup>4)</sup> Xanthin mit 15 % iger Salzsäure auf 50—60° und trägt chloresäures Kali ein, so entsteht Alloxan. Dieselbe Zersetzung erfolgt beim Kochen von Xanthin mit Chlorwasser. Verdampft man einige Tropfen der Lösung vorsichtig auf dem Platinblech, so bleibt ein schwach gelblicher Rückstand, der sich bei wenig höherer Temperatur rot färbt und mit Ammoniak eine purpurfarbene Lösung liefert.

Die Probe mit Salzsäure und Kaliumchlorat ist jedoch nicht ohne weiteres an die Stelle des ursprünglichen Verfahrens mit Chlor zu setzen.

b) Die „Xanthinprobe“ mit Salpetersäure. Man löst eine kleine Menge Substanz in heisser Salpetersäure und verdampft über

<sup>1)</sup> B. B. 37. 636 (1904), Zeitschr. f. ph. Ch. 43. 501. 1905. 51. 425. 1907.

<sup>2)</sup> Weidel, Ann. d. Ch. u. Pharm. 158. 365. 1871. — Kossel, Zeitschr. f. physiol. Ch. 6. 426. — Salomon, Ber. d. chem. Gesellsch. 16. 198.; 18. 3408; Zeitschr. f. klin. Med. a. a. O. 76.

<sup>3)</sup> C. Fr. W. Krukenberg und H. Wagner, Sitzungsber. d. Würzburger physik.-med. Gesellsch. 1883. — Salomon, Du Bois' Archiv 1884. 175. — Scherer, Ann. d. Ch. u. Pharm. 112. 267. 1859. — Salomon, Zeitschr. f. physiol. Ch. 11. 411. 1887. — Kossel, Zeitschr. f. physiol. Ch. 10. 255. 1886.

<sup>4)</sup> E. Fischer, Ann. d. Chemie 215. 310. 1882.

freiem Feuer oder besser im Wasserbade zur Trockne. Bei Gegenwart von Xanthin (Marcet; Liebig und Wöhler; Strecker) und von Guanin (Strecker) hinterbleibt ein zitronengelber Fleck, der sich in Natron- oder Kalilauge mit orangegelber Farbe löst. Dampft man die Lösung ein, so färbt sie sich violettrot und lässt einen dunkel-purpurnen Rückstand (Strecker) zurück, der bei scharfem Trocknen endlich rein indigoblau, an feuchter Luft aber wieder violett wird (Brücke<sup>1</sup>). Salmiak macht die Lösung wieder gelb. — Das Epiguanin gibt diese Reaktion gleichfalls, das Hetero- und das Paraxanthin dagegen nicht (Salomon), ebenso wenig das Hypoxanthin (Salomon, Kossel) und das Adenin (Kossel).

Die Probe beruht beim Xanthin und Guanin auf der Bildung von Nitroxanthin, welche beim Eindampfen von Xanthin oder Guanin mit Salpetersäure vor sich geht.

Bei gleichzeitiger Gegenwart selbst nur von Spuren Chlor oder Chlorid wird nach Stadthagen<sup>2</sup>) der weisse oder gelbe Rückstand, der bei weiterem Trocknen meistens rötlich wird, beim Befeuchten mit Ammoniak dunkelrosenrot bis purpurn, mit Kalilauge blauviolett (Murexidprobe).

Das Adenin und das Hypoxanthin sind die einzigen Basen, welche keine der beiden Farbenreaktionen geben. Das Xanthin allein gibt dagegen die Weidelsche und die Xanthinprobe.

c) Das Xanthin bildet, wenn man ein Körnchen desselben in eine Mischung von Chlorkalk und Natronlauge legt, einen grünen, ins Braune übergehenden Hof, das Hypoxanthin nicht.

d) Behandelt man Adenin oder Hypoxanthin mit Zink und Salzsäure und neutralisiert darnach das Filtrat oder macht es alkalisch, so färbt sich die Flüssigkeit an der Luft rot und braunrot (Kossel).

e) Adeninlösung nimmt mit Eisenchlorid eine stark rote Färbung an (Krüger).

f) Löst man 0,1 Substanz in 5 ccm heisser verdünnter Natronlauge und fügt nach dem Erkalten ein wenig Diazobenzolsulfosäure hinzu, so erhält man bei Anwesenheit von Guanin, Adenin, Hypoxanthin, Xanthin und den Methylxanthinen mit Ausnahme des Kaffeins, Theobromins, Paraxanthins und Heteroxanthins, Rotfärbung<sup>3</sup>).

g) Die Purinstoffe geben mit einer alkalischen Lösung von Metadinitrobenzol eine Purpurfärbung. Die Färbung hängt von der Konzentration aller beteiligten Faktoren ab. Sie wird durch den Luftsauerstoff zerstört. Man hat daher die Mischung mit Vaselineöl oder ähnlichem zu bedecken. Bei gleichen Mengen Ätznatron und konzentriertem Metadinitrobenzol wechselt die Färbung mit der Konzentration an Purinstoff. Darauf wurde eine kolorimetrische Schätzung der Harnsäure begründet (A. Morel und H. Chavassieu<sup>4</sup>)).

<sup>1</sup>) Liebig und Wöhler, Ann. d. Ch. u. Pharm. **26**. 341. 1838. — Strecker, Ann. d. Ch. u. Pharm. **108**. 137 f. 1858. — E. Brücke, Monatsh. f. Ch. **7**. 617. 1886.

<sup>2</sup>) Stadthagen, Virchows Arch. **109**. 395.

<sup>3</sup>) R. Burian, B. B. **37**. 696. 1904; Zeitschr. f. phys. Ch. **43**. 501. 1905; ebenda **51**. 425. 1907.

<sup>4</sup>) Bull. soc. chem. de France **1**. 520. 1907; nach J. T. **37**.

h) Als leicht oxydable Stoffe wirken die Purinsubstanzen besonders bei alkalischer Reaktion reduzierend. Darauf ist die Blaufärbung zu beziehen, die namentlich die Harnsäure mit Phosphorwolfram- oder Phosphormolybdänsäure und Alkali geben <sup>1)</sup>.

### 18. Zersetzungen.

Bei der Stickstoffbestimmung nach Kjeldahl wird vom Xanthin und Guanin aller Stickstoff gefunden, durch Phosphorsäure zersetzt sich das Xanthin bei 150° unvollständig, und gibt das Guanin nur eine geringe Menge seines Stickstoffs ab, bei 230° aber allen als Ammoniak. Beim Erhitzen mit alkalischer Chlorbaryumlösung auf 150° liefert das Xanthin etwas über  $\frac{1}{4}$  der bei der Zersetzung möglichen Kohlensäure, das Guanin gleichfalls nur wenig Kohlensäure und Ammoniak, bei 230° dagegen gibt das Xanthin auf das Mol. 2 Mol. Kohlensäure, das Guanin 2 Mol. Kohlensäure und 5 Mol. Ammoniak (Schöndorff <sup>2)</sup>). Durch Laugen und durch Salpetersäure in der Hitze werden die meisten Purine zersetzt. Durch salpetrige Säure wird die Aminogruppe der Aminopurine in die OH- bzw. O-Gruppe übergeführt. Dieselbe Umwandlung können die Aminopurine durch längeres Kochen mit starken Mineralsäuren erleiden <sup>3)</sup>.

Die Purine sind schliesslich dem zersetzenden Einflusse von Bakterien und Fermenten sehr zugänglich.

Durch die Pankreasfäulnis werden nach Baginsky Guanin, Xanthin und Hypoxanthin zerstört, das Hypoxanthin am wenigsten; nach Schindler <sup>4)</sup> wird dabei zunächst das Guanin in Xanthin, das Adenin in Hypoxanthin übergeführt.

Fäulnis des Stuhles vermindert dessen Basengehalt <sup>5)</sup>. Das Harnsäurebakterium greift Guanin nicht an, wohl aber ein aus Taubenmist isoliertes Bakterium <sup>6)</sup>. Reinkulturen von Koli- und Fäkalbakterien zersetzten Guanin und Adenin über Xanthin und Hypoxanthin vollständig <sup>7)</sup>. Von den Fermenten der tierischen Organe werden die Purine desamidiert und oxydiert, es entsteht als Endprodukt Harnsäure und Allantoin (s. o. S. 909). Auch in Pflanzen sind derartige Fermente gefunden worden, so in der Hefe <sup>8)</sup>.

Durch die elektrolytische Reduktion werden die Oxypurine in die entsprechenden Dihydroverbindungen umgewandelt, in denen der Sauerstoff durch H<sub>2</sub> ersetzt ist (Tafel <sup>9)</sup>).

### III. Bestimmung des Gesamt-Purin-Stickstoffs.

Die Purinstoffe werden durch ammoniakalische Silberlösung oder durch Kupfersulfat und Natriumbisulfid als Kupferoxydulverbindungen quantitativ niedergeschlagen und der Stickstoff der gut gewaschenen Niederschläge nach Kjeldahl bestimmt. Wenn Nucleinsäure zugegen ist, so sind beide Fällungen unvollständig, man hat dann vor der Verarbeitung den Harn 2—3 Stunden mit 2—3%iger Schwefelsäure zu

<sup>1)</sup> Vgl. auch Riegler, Wien. med. Bl. 24. 789. 1901.

<sup>2)</sup> B. Schöndorff, Pflügers Arch. 62. 41. 1895.

<sup>3)</sup> E. Fischer, B. B. 43. 803. 1910.

<sup>4)</sup> A. Baginsky, Zeitschr. f. physiol. Ch. S. 396. — G. Schindler, Zeitschr. f. physiol. Ch. 13. 439. 1889.

<sup>5)</sup> A. Schittenhelm, Zeitschr. f. ph. Ch. 39. 199. 1903.

<sup>6)</sup> C. Ulpiani u. M. Cingolani, Atti real. acc. dei lincei Roma 14. II. 596. 1906.

<sup>7)</sup> Schittenhelm und Fr. Schröter, Zentralbl. f. Stoffw. u. Verdauungs-krankh. 6. 319. 1905.

<sup>8)</sup> M. N. Straughen und W. Jones, Journ. of. biol. Ch. 6. 245. 1909.

<sup>9)</sup> B. B. 33. 33 69. 1910; 34. 1165 u. 1170. 1901.; 33 1371; 40. 3752. 1907; 40. 3757. 1907.



kochen und dadurch die Nucleinsäure zu zerstören, deren Purinbasen dann bei der folgenden Bestimmung mit bestimmt werden. Eine indirekte Bestimmungsmethode durch Bestimmung des Silbergehaltes der durch ammoniakalische Silberlösung und Magnesiamixtur erhaltenen Fällung ist nicht möglich, da der Silbergehalt der Silberoxydulverbindungen aller Purinstoffe nicht gleich ist. Die Basenverbindungen enthalten auf ein Mol Purinsubstanz 2 Atome, die Harnsäureverbindung 1 Atom Silber. Die indirekte Bestimmung durch Bestimmung des Kupfergehaltes des Niederschlages ist ebenfalls nicht möglich (siehe weiter unten). Weder durch die eine noch die andere Methode werden auch Kaffein, Theobromin und Allantoin mit gefällt. Diese Stoffe, die in physiologischer Beziehung ebenfalls der Gesamtpurinfraktion zugezählt werden müssen, müssen daher, wenn vorhanden, in einer zweiten bzw. dritten Harnportion für sich bestimmt werden. Der sich aus diesen Bestimmungen ergebende Kaffein-, Theobromin- und Allantoin-N ist dann dem nach den beiden zu beschreibenden Methoden ermittelten „Gesamtpurin-N“ zuzuzählen.

#### 1. Fällung als Silberoxydulverbindungen. Verfahren nach Camerer-Arnstein.

A. Prinzip. Camerer<sup>1)</sup> fällt den Harn mit Magnesiamischung aus, das Filtrat mit ammoniakalischer Silberlösung und bestimmt im Silberniederschlag den Stickstoff. Das bei der Fällung mit ammoniakalischer Silberlösung mit den Purinstoffen ausfallende Rhodansilber wird nach Arnstein durch reichlichen Ammoniakzusatz in Lösung gebracht, bzw. fällt bei der zu beschreibenden Arbeitsweise infolge des grossen Ammoniaküberschusses gar nicht aus. Spuren Eiweiss schaden der Bestimmung nichts. Enthält der Harn aber Eiweiss in solchen Mengen, dass es durch die gebräuchlichen Methoden nachgewiesen werden kann, so muss es entfernt werden, wozu Kochen des Harns bei geeignetem Zusatz von Essigsäure das passendste Verfahren ist. Harnpepton bleibt bei der Silberfällung in Lösung. Durch die Magnesiamischung wird auch die gesamte Phosphorsäure als Tripelphosphat in Verbindung mit Ammoniak und Magnesium gefällt. Diese Beimengung würde wegen ihres Ammoniakgehaltes die Ermittlung des Purinstickstoffes durch Verarbeitung der Fällung nach Kjeldahl unmöglich machen. Man fällt daher den Harn vor dem Zusatz der ammoniakalischen Silberlösung mit Magnesiamischung aus. Diese vorbereitende Fällung hat nach Arnstein noch den Vorteil, dass durch dieselbe geringe Mengen Eiweiss (0,05%, aber nicht mehr als 0,15%) aus dem Harn entfernt werden. Arnstein hat ferner nachgewiesen, dass bei

<sup>1)</sup> W. Camerer, Zeitschr. f. Biol. 26. 104. 1890; 28. 72. 1891.



der vorläufigen Fällung des Harns mit Magnesiamischung kein Verlust an Harnsäure (durch Ausfallen des schwer löslichen Ammonurats) eintritt, wenn man mit dem Abfiltrieren des Tripelphosphats nicht stundenlang wartet (wohl könnte aber, wenn reichlich vorhanden, Guanin gefällt werden), und dass die Spur Tripelphosphat, welche in Lösung bleibt, ohne Einfluss auf die Bestimmung des Stickstoffs ist.

#### B. Erfordernisse.

1. Magnesiamischung.
2. Ammoniakalische Silberlösung, beide nach Ludwig, S. 1052.
3. 20 %iger Ammoniak.
4. Die Erfordernisse zur Stickstoffbestimmung nach Kjeldahl, S. 481.

#### C. Ausführung.

Die Grenze des Eiweissgehaltes, welchen der Harn ohne Nachteil für die Analyse besitzen darf, liegt zwischen 0,05—0,15%; da sich die Eiweissmenge nicht sicher schätzen und nicht schnell genug bestimmen lässt, tut man gut, jeden eiweisshaltigen Harn durch Kochen bei passend saurer Reaktion vom Eiweiss zu befreien. Enthält der Harn ein Uratsediment, so bringt man dasselbe entweder durch Alkalizusatz oder dadurch in Lösung, dass man den Harn einige Stunden im Brutschrank bei 40—45° stehen lässt.

Nach den Ermittlungen von Arnstein<sup>1)</sup> verfährt man bei der Anstellung der Analyse in folgender Weise. Es werden 240 ccm Harn in einem Masszylinder mit 30 ccm Magnesiamischung versetzt und mit 20%igem Ammoniak auf 300 ccm aufgefüllt. Man kann sogleich filtrieren oder den Niederschlag sich erst absetzen lassen. Vom Filtrat misst man für 2 Bestimmungen je 125 ccm (= 100 Harn) ab und setzt zu jeder Probe 10 ccm ammoniakalischer Silberlösung. Den Niederschlag bringt man, ohne lange zu warten, auf ein etwa 10 cm im Durchmesser haltendes Saugfilter aus aschefreiem Papier. Geht die Flüssigkeit anfangs nicht ganz klar durchs Filter, was sich nur durch eine schwache, homogene Trübung kenntlich macht, so giesst man die ersten 50 ccm des Filtrats in das Becherglas zurück, spült die Filtrierflasche einigemal mit wenig Wasser nach und vereinigt das Waschwasser mit der Flüssigkeit im Becherglase. Das Filter ist durch den bereits auf dasselbe gebrachten Niederschlag so dicht geworden, dass der Niederschlag nun vollständig zurückgehalten wird. Die Filtration geht langsam vonstatten, aber von dem wiederholt empfohlenen Zusätze schwer löslicher oder unlöslicher Substanzen (Natriumbicarbonat, Calciumcarbonat, Talk) hat man keinen Vorteil. Das Becherglas wird sorgfältig mit schwach ammoniakhaltigem Wasser nachgewaschen. Wenn der Niederschlag voll-

<sup>1)</sup> R. Arnstein, Zeitschr. f. physiol. Ch. 23. 426. 1897.

ständig auf das Filter gebracht ist, muss er völlig ammoniakfrei gewaschen werden. Übergiesst man den feuchten Niederschlag mit Wasser, so geht die Filtration sehr langsam vor sich. Viel schneller und nicht minder sicher erreicht man dieses Ziel, wenn man den Niederschlag so weit trocken saugt, dass er rissig wird, und ihn erst dann zu waschen anfängt. Füllt man dabei das Filter jedesmal ganz voll mit Wasser, so verbraucht man ungefähr 250—300 ccm Wasser und vollendet das Auswaschen in 10—20 Minuten. Als ammoniakfrei kann man das Filtrat betrachten, wenn die Waschflüssigkeit auf empfindliches Lackmuspapier nicht mehr alkalisch reagiert.

Um das Filtrat auf seine Reaktion zu prüfen, verfährt man in der Weise, dass man die Filtrierflasche und alle in sie hineinreichenden Teile des Apparats gründlich wäscht, dann wieder vor der Pumpe filtriert und nun die an der Spitze des Trichters haftende Flüssigkeit auf ihre Reaktion untersucht. Der Ammoniakdampf kommt mit allen Teilen des Apparats in der Flasche in Berührung; unterlässt man die Reinigung dieser Teile, so nimmt die alkalische Reaktion kein Ende, auch wenn vom Filter schon längst ammoniakfreie Flüssigkeit abgelaufen ist.

Vor der Belichtung braucht man den Niederschlag nicht ängstlich zu hüten; es ist nicht nötig, dass man im Dunkeln filtriert, es genügt, wenn man vom Niederschlage sehr helles Tageslicht abhält, etwa durch einen Vorhang vor dem Fenster.

Der Niederschlag enthält ausser der Harnsäure und den Xanthinbasen, wie Salkowski nachgewiesen hat, noch Ammoniak, von welchem er noch zu befreien ist, wenn die Stickstoffbestimmung nicht unrichtig ausfallen soll. Man erreicht das nach Arnstein<sup>1)</sup> leicht durch Kochen des Niederschlages (samt Filter) mit Wasser und etwas Magnesia. Zur Oxydation nach Kjeldahl verwendet man 15 ccm Schwefelsäure, 0,5 g Kupfervitriol und 10 g Kaliumsulfat, die man gleich anfangs auf einmal zusetzt. Auf den Stickstoffgehalt des Filters braucht man keine Rücksicht zu nehmen, da ein ausgewaschenes, aschefreies Filter von der erforderlichen Grösse nur wenige Hundertstel mg Stickstoff enthält.

Bei der Verarbeitung von Kaninchen- und Hundeharn nach dieser Methode erhält man in vielen Fällen überhaupt keinen Niederschlag nach Zusatz der ammoniakalischen Silberlösung. In anderen Fällen wird man durch weitgehende, sehr rasch einsetzende Reduktion des Silbers gestört. Das letztere tritt namentlich dann öfter ein, wenn zu wenig Magnesiumsalz zugegen ist. Man soll daher bei diesen Harnen einen grossen Überschuss von Magnesiamixtur verwenden. Die Filtration geht meist äusserst langsam vonstatten und stockt eventuell ganz. Ich habe gefunden, dass man alle diese Übelstände vermeiden kann, wenn man den Harn vor der Behandlung mit Magnesiamixtur mit soviel einer 1%igen Phosphorwolframsäurelösung ausfällt, dass im

<sup>1)</sup> Salkowski, Pflügers Arch. **69**. 273. 1898. — Arnstein, Zentralbl. f. d. med. Wissensch. **15**. 257. 1898.

Filtrat keine Phosphorwolframsäure vorhanden ist. Das Verfahren gründet sich auf die Beobachtung, dass bei einem derartig bemessenen Zusatz von Phosphorwolframsäure weder Purinbasen noch Harnsäure, wenn sie in starker Verdünnung zugegen sind, gefällt werden, dass aber eine Summe von kolloiden, offenbar eiweissartigen Stoffen, die für die spätere Fällung ein Hemmnis sind und die Filtration erschweren, hierdurch beseitigt werden. Man versetzt den verdünnten Harn in einem Messzylinder mit 1% an rauchender Salzsäure und tastet in kleinen Proben à 2 ccm diejenige grösste Menge 1%iger Phosphorwolframsäure aus, nach deren Zusatz im Filtrate durch den verwendeten Harn oder eine 5%ige Chininhydrochloridlösung keine Trübung entsteht. (Chinin hat sich nach Versuchen von Bass als sehr zweckmässiges und empfindliches Reagens auf Phosphorwolframsäure erwiesen.) Nach dem Ergebnis dieser Proben berechnet man die dem Harn zuzusetzende Menge der 1%igen Phosphorwolframsäurelösung, setzt sie zu, liest das Volumen ab und filtriert von der braunen flockigen Fällung ab. Die Filtration geht ungemein rasch vonstatten. Mit einem aliquoten Filtratsteile verfährt man dann weiter nach Camerer-Arnstein. Auch im Menschenharn erhält man bei dieser Behandlung mit Phosphorwolframsäure eine geringe braune Fällung. Man erhält dann stets im Tierharn — auch in solchen, welche ohne diese Behandlung keinen Purinniederschlag ergeben hatten — eine deutliche Fällung, die beim Kaninchen- und Hundeharn zum grössten Teil aus der Magnesium-Silberverbindung der Harnsäure besteht.

Ein zweiter Fehler ist möglicherweise in einem zu grossen Ammoniakgehalte der zur Fällung mit Silberlösung benützten Filtrate zu suchen. Obzwar im allgemeinen die meisten Basen und insbesondere die Harnsäure auch bei reichlichem Ammoniaküberschuss quantitativ ausfallen, so werden vielleicht andere, sonst weniger wirksame Hemmnisse bei Anwesenheit von grossen Mengen von Ammoniak wirksam. Der Purinniederschlag mit ammoniakalischer Silberlösung ist in Ammoniak nicht absolut unlöslich<sup>1)</sup>. Wie sich diese Verhältnisse im Harn ergeben, haben wir noch nicht ermittelt, aber Bass hat gefunden, dass bei der Verarbeitung von Blut auf Purinstoffe nach einer im wesentlichen auf die erwähnte Verwendung der Phosphorwolframsäure zur vorläufigen Reinigung begründeten Methode, bei der Fällung nach Camerer-Arnstein erst dann ein Niederschlag eintrat, wenn statt ammoniakalischer eine gewöhnliche 10%ige Lösung von Silbernitrat zugesetzt wurde. Hierbei entsteht zunächst eine Fällung von Chlor-

<sup>1)</sup> Salkowski, Virchows Arch. 50. 193. — Salomon, B.B. 16. 195. 1883; Zeitschr. f. klin. Med. 7. Suppl.-Heft 65. 1884; vgl. auch Kennaway, Journ. of phys. 31. 8. 1909.



silber, die sich beim Umschwenken solange löst, als das vorhandene Ammoniak ausreicht, dann bleibt der Silberchloridniederschlag bestehen. Bei diesem Vorgehen erhielten wir in fast allen Fällen, auch in denen, welche nach dem gewöhnlichen Verfahren keine Purinfällung ergaben, eine solche. Nach dem Zersetzen derselben durch Schwefelwasserstoff (eventuell unter Zusatz von wenig Kupfersalzlösung <sup>1)</sup>) erhält man klare Filtrate, welche nun in der typischen Weise mit ammoniakalischer Silberlösung oder Kupfersulfat-Bisulfit reagieren. Es wäre daran zu denken, in ähnlicher Weise im Harn vorzugehen und die erste mit Silberchlorid verunreinigte Fällung, die möglicherweise auch noch andere als nur Purinstoffe enthalten kann, nach dem Zersetzen zur definitiven Purinfällung zu verwenden.

Statt der ammoniakalischen Silberlösung verwenden Rudisch und Boro-schek <sup>2)</sup> Soda und eine Auflösung von Chlorsilber in Natriumsulfitlösung. 100 neutralen Harns werden mit 15 cem einer gesättigten Sodalösung und 10 cem einer n/20-Silberchloridlösung in Natriumsulfitlösung versetzt. Im gewaschenen Niederschlag das Silber zu titrieren, wie die Autoren vorschlagen, geht wegen der oben erwähnten Verschiedenheit des Silbergehaltes der Basen- und der Harnsäureverbindung nicht an. Bei der Verarbeitung des Niederschlags nach Kjeldahl wird man die Fehler, die aus der eventuellen Anwesenheit von Tripelphosphat im Niederschlag (in ammoniakhaltigen Harnen) resultieren können, im Auge behalten müssen.

Aus dem gleichen Grunde wie oben ist der Vorschlag von Rudisch und Kleeberg <sup>3)</sup>, nach der Silberfällung den Silberüberschuss mit Jod zurückzutitrieren, unbrauchbar. Sie versetzten 110 Harn mit 55 n/50-Silberlösung und 55 Ammoniak. 100 Filtrat sollen so lange mit n/05 Kaliumjodidlösung versetzt werden bis eine herausgenommene Probe einen Überschuss an Jodid aufweist. Als Reagens wird eine Mischung von Nitrit, Schwefelsäure und Stärkekleister verwendet, die bei Anwesenheit von Jodid mit der herausgenommenen Probe geschichtet sich bläut.

Jolles kocht aus dem Silberniederschlag das Ammoniak weg, zerlegt ihn durch Natriumsulfid, versetzt mit Schwefelsäure, oxydiert mit Permanganatlösung und bestimmt den gebildeten Harnstoff azotometrisch <sup>4)</sup>.

Bonnet <sup>5)</sup> verteilt den Silberniederschlag in 100 Wasser, setzt 20 cem konzentrierte Schwefelsäure zu und titriert mit Chamäleonlösung wie bei der Harnsäurebestimmung.

W. Hall <sup>6)</sup> misst die Menge der Gesamtpurine an der Masse des Silberniederschlags, die er in einem graduierten und empirisch geeichten Cylinder abliest. Der Cylinder ist durch einen Hahn, dessen Bohrung dasselbe Lumen hat wie der Cylinder, in zwei Teile geteilt. Bei offenem Hahn werden 90 cem Harn mit 20 cem Magnesia-mischung (100 Ludwigsche Magnesiamischung, 100 20 %iges Ammoniak und 10 Talk) versetzt. Nachdem sich die Phosphate abgesetzt haben, wird der Hahn geschlossen und bis zur Marke 100 mit Silberlösung aufgefüllt (1 g Silbernitrat, 100 konzentriertes Ammoniak, 100 Wasser und 5 g Talk). Man lässt den Niederschlag im Dunkeln absitzen und liest ab.

<sup>1)</sup> Folin und Shaffer, Zeitschr. f. ph. Ch. **32**. 553. 1901.

<sup>2)</sup> Journ. of the am. Ch. soc. **24**. 562. 1902; Chem. Zentralbl. 1902. II. 486.

<sup>3)</sup> Am. Journ. med. sciences **128**. 899. 1904.

<sup>4)</sup> Zeitschr. f. ph. Ch. **29**. 222. 1900; Monatsh. f. Ch. **21**. 319. 1900; Zentralbl. f. inn. Med. **21**. 905. 1900.

<sup>5)</sup> Thèse Lyon 1903/04.

<sup>6)</sup> Wien. klin. Wochenschr. **16**. 411. 1903. — Dissert. Manchester 1902; Arch. général de med. **190**. 397. 1902. — Schmidt, Münch. med. Wochenschr. 1911. 1764. — A. Rybokowski, Dissert. Petersburg 1904.



## 2. Fällung als Kupferoxydulverbindungen nach Krüger und Schmid<sup>1)</sup>.

Prinzip: Sämtliche Purinstoffe des Harns mit Ausnahme von Kaffein und Theobromin werden durch eine saure Lösung von Kupferoxydul in der Hitze gefällt. Nach Huppert<sup>2)</sup> werden hierbei auch Rhodan, Eiweiss und Albumosen quantitativ gefällt. Aus Hundeharn fällt nach Solomin dabei auch die Kynurensäure<sup>3)</sup>. Das ursprünglich von Krüger und Wulf<sup>4)</sup> angegebene Verfahren zur Bestimmung der Xanthinbasen ist demnach in seiner Originalform zur Bestimmung des Gesamtpurin-N nicht geeignet, es liefert zu hohe Werte. Krüger und Schmid haben dann gezeigt, dass die genannten Verunreinigungen der Purinkupferoxydulfällung zusammen mit einem Rest von Harnsäure zerstört werden, wenn man nach dem Abtrennen der Harnsäure aus dem durch Sulfid zerlegten Niederschlage durch Säure, die verbleibende Basenlösung mit aufgeschwemmtem Braunstein bei essigsaurer Reaktion in der Wärme kurze Zeit digeriert. In dem Filtrate müssen dann die Basen wieder als Kupferoxydul- oder als Silberoxydulverbindungen abgeschieden werden. Aus den Werten für Harnsäure und Basen wird dann der Gesamt-Purin-N berechnet. Will man die Methode zur direkten Bestimmung des Gesamt-Purin-N benützen, so hat man den erhaltenen Niederschlag durch Sulfid oder Schwefelwasserstoff zu zersetzen und in dem erhaltenen Filtrate eine Silberfällung durch ammoniakalische Silberlösung und Magnesiamixtur zu erzeugen, die man dann nach der oben bei 1. beschriebenen Vorbereitung der N-Bestimmung nach Kjeldahl unterwerfen kann.

### Erfordernisse:

1. Käufliche 40 %ige Natriumbisulfidlösung.
2. 10 %ige Kupfersulfatlösung.
3. Krystallisiertes Natriumacetat.
4. Schwefelwasserstoff oder eine Natriumsulfidlösung nach Ludwig (s. S.1052).

Ausführung: 400 ccm eiweissfreien (eventuell durch Kochen mit Essigsäure enteweissten) Harns werden in einem einen Liter fassenden Kolben mit 24 g Natriumacetat und 40 ccm Bisulfitlauge zum Sieden erhitzt. Hierauf setzt man langsam (je nach der Menge der vorhandenen Purinstoffe) 40—80 ccm Kupferlösung zu und erhält mindestens 3 Minuten im Sieden. Ein etwa vorhandenes Sediment ist wie bei 1. vorher in Lösung zu bringen. Der dunkelbraune — meist mit etwas pulverigem Kupferoxydul vermengte — flockige Niederschlag wird sofort oder nach dem Erkalten auf einem Filter gesammelt und solange ge-

<sup>1)</sup> Zeitschr. f. ph. Ch. **32**. 104; **45**. 1. 1905.

<sup>2)</sup> Ebenda, **22**. 556. 1897.

<sup>3)</sup> Ebenda, **23**. 501. 1897.

<sup>4)</sup> Ebenda, **20**. 181. 1894.

waschen, bis das Waschwasser farblos abläuft (eventuell sulfat- oder kupferfrei gewaschen). Da sich der Niederschlag zumeist nicht gut vom Filter abspritzen lässt, so bringt man ihn zweckmässig mit dem Filter in den Kolben zurück, setzt ca. 200 ccm Wasser zu, verschliesst mit einem Stopfen und verteilt das Filter durch kräftiges Schütteln. Nach dem Abspülen des Kolbenhalses und Stopfens versetzt man mit wenigen ccm verdünnter Salzsäure, erhitzt zum Sieden und leitet Schwefelwasserstoff bis zur völligen Zersetzung des Niederschlages ein. Der überschüssige Schwefelwasserstoff wird dann durch Kochen entfernt. Man kocht so lange, bis ein in die Dämpfe gehaltenes, mit Blei- oder Silberlösung befeuchtetes Papier nicht mehr geschwärzt wird. Man kann auch statt mit Schwefelwasserstoff mit 30 ccm der Natriumsulfidlösung eben zum Sieden erhitzen, dann mit Essigsäure ansäuern und bis zum völlig klaren Absetzen des Niederschlages kochen. Hierauf filtriert man, zweckmässig auf der Nutsche, und wäscht gründlich mit heissem Wasser aus. Filtrat und Waschwasser werden dann mit Ammoniak neutralisiert und in derselben Weise wie bei der Harnsäurebestimmung nach Ludwig (S. 1052) mit einer Mischung von gleichen Teilen Magnesiamixtur und ammoniakalischer Silberlösung, in welcher man den entstandenen Silberchloridniederschlag durch den gerade ausreichenden Ammoniakzusatz in Lösung gebracht hat, gefällt. Mit dem ammoniakfrei gewaschenen Niederschlage verfährt man dann genau nach Camerer-Arnstein weiter.

Nach Benedikt und Saiki<sup>1)</sup> findet man bei der Kupfermethode oft weniger Gesamt-Purin-N als der gleichzeitig nach Folin-Schaffer im Menschenharn bestimmten Harnsäure entspricht. Die Methode liefert also unter Umständen zu niedrige Werte, während sie a priori zu hohe liefern sollte (s. o. S. 946). Worauf das beruht, ist nicht bekannt. Nach den beiden Autoren erhält man aber brauchbare Resultate, wenn man vor der Fällung pro 300 ccm Harn 20 ccm Eisessig zusetzt.

Tierische Harne (Kaninchen-, Schweine-, Hundeharn) filtrieren sehr schlecht. Nach Schittenhelm<sup>2)</sup> hat es sich zur Vermeidung dieses Übelstandes als zweckmässig erwiesen, den Harn vor der Fällung 2—3 Stunden mit 2—3%iger Schwefelsäure auf dem Rückflusskühler zu kochen, dann nach dem Abkühlen mit Lauge alkalisch und mit Essigsäure wieder sauer zu machen und von dem zurückbleibenden dunkelbraunen Niederschlage abzufiltrieren. Man wäscht das Filter mit heissem Wasser gründlich aus und nimmt dann die Fällung vor. Die weitere Verarbeitung geht dann glatt vonstatten.

<sup>1)</sup> Journ. of biolog. Ch. 7. 27. 1909. — Über eine Änderung vgl. W. Jones, Journ. of biol. Ch. 9. 129. 1911.

<sup>2)</sup> Abderhalden, Handb. d. biolog. Arbeitsmethode. 3. 887.

Denigès<sup>1)</sup> fällt den Harn in der Hitze mit Kupfersulfat und Natriumthiosulfat aus, wobei nach Monfet<sup>1)</sup> übrigens nur die  $\text{Cu}_2\text{O}$ -Verbindung der Harnsäure ausfallen soll (?), und titriert in dem kupferfreigewaschenen Niederschlage das Kupfer mit Cyanidlösung.

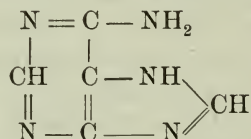
Mallet<sup>2)</sup> fällt 100 ccm Harn mit 10 ccm 16 %iger Sodalösung und 82 ccm Filtrat durch 5 ccm Kupferlösung und 20 ccm einer Lösung, welche im Liter 100 g Thiosulfat und 100 g Seignettesalz enthält. Der Niederschlag wird alkalifrei gewaschen, in 500 ccm Wasser verteilt, mit 5 ccm konzentrierter Schwefelsäure versetzt und mit n/10-Permanganatlösung titriert. (Auch das letztere Vorgehen ist als eine Harnsäurebestimmung gedacht.)

## B. Die Purinbasen.

### I. Die einzelnen Purinbasen.

#### 1. Adenin.

6-Aminopurin,  $\text{C}_5\text{H}_5\text{N}_5$ . Mol.-Gew. 135,05. C = 44,44%; H = 3,71%; N = 51,85%.



Es wurde von Kossel<sup>3)</sup> im Pankreas entdeckt.

Vorkommen: Gebunden in der Nucleinsäure, frei: in den Teeblättern<sup>4)</sup>, im Zuckerrübensaft<sup>5)</sup>, in Bambusschösslingen<sup>6)</sup>, im Harn<sup>7)</sup>, in den Fäces<sup>8)</sup>, im Steinpilz (*Boletus edulis*)<sup>9)</sup>. Stadthagen hat es in 10 Liter leukämischen Harns aufgefunden, in ebensoviel normalen Harn war es dagegen nicht nachweisbar<sup>10)</sup>.

Es entsteht synthetisch aus Trichlorpurin durch Behandeln mit Ammoniak und nachträgliche Reduktion mit Jodwasserstoff<sup>11)</sup>, ferner nach Traube<sup>12)</sup> in folgender Weise: Aus Thioharnstoff und Malonitril entsteht bei Gegenwart von Natriumalkoholat das entsprechende Thiopyrimidin, welches mit salpetriger Säure ein Isonitrosoderivat liefert. Dieses geht durch Schwefelammon reduziert in Triaminothiopyrimidin

<sup>1)</sup> L. Monfet, C. r. soc. biol. **32**. 1016. 1900.

<sup>2)</sup> Ann. ch. appl. **4**. 82; Chem. Zentralbl. 1899. I. 906. J.T. 29.

<sup>3)</sup> B. B. **18**. 78. 1885; Zeitschr. f. ph. Ch. **10**. 250. 1886; **12**. 241. 1888. — Schindler, ebenda, **13**. 432. 1889.

<sup>4)</sup> Krüger, Zeitschr. f. ph. Ch. **16**. 161. 1892.

<sup>5)</sup> Lippmann, B. B. **29**. 2651. 1896.

<sup>6)</sup> Totani, Zeitschr. f. ph. Ch. **62**. 113. 1909.

<sup>7)</sup> Krüger und Salomon, Zeitschr. f. ph. Ch. **24**. 1898.

<sup>8)</sup> Krüger und Schittenhelm, ebenda, **35**. 153. 1902.

<sup>9)</sup> Yoshimura, Zeitschr. f. Unters. d. Nahr.- u. Genussmitt. **20**. 153. 1910.

<sup>10)</sup> Virchows Arch. **109**. 415.

<sup>11)</sup> E. Fischer, B. B. **30**. 2226. 1897.

<sup>12)</sup> Ann. d. Ch. u. Pharm. **331**. 64. 1904.



über, dessen mit Ameisensäure erhaltliche Formylverbindung beim Erhitzen in 6-Aminothiopurin übergeht. Durch Behandeln mit Wasserstoffperoxyd wird dann Adenin erhalten.

Durch Hydrolyse wird es aus den Nucleinsäuren und dem Adenosin <sup>1)</sup> erhalten.

Nach Adeninfütterung bilden sich beim Hund, Kaninchen und der Ratte in den Nieren Ablagerungen von 6-Amino-2-8-Dioxyypurin <sup>2)</sup>.

#### Eigenschaften.

1. Aus verdünnten kalten Lösungen mit  $3\text{H}_2\text{O}$  in langen Nadeln, aus warmen oder unreinen Lösungen amorph oder nur in mikroskopischen, langen, glatten, sechseitigen, auch büschelförmig gruppierten Prismen (Kossel<sup>3)</sup>). Krystallisiert auch wasserfrei in mikroskopisch kleinen wetzsteinförmigen Krystallen (gestreckten Pyramiden, auch in stechapfelförmigen Drusen solcher), beim Übersättigen konzentrierter Lösungen des Chlorids mit Ammoniak (oder kohlensaurem Ammon) oder beim Einleiten von Kohlensäure in eine alkalische Lösung. Beim Umkrystallisieren aus siedendem Wasser erhält man etwas grössere einzelne oder zu Stechapfelformen angeordnete vierseitige Pyramiden, auch häufig Zwillinge nach der Basis, seltener Durchwachsungen (Krüger<sup>4)</sup>). Die wasserhaltigen Krystalle werden an der Luft bald undurchsichtig, schneller in der Wärme; die Trübung in wenig Wasser suspendierter Krystalle tritt bei  $53^\circ$  plötzlich ein. Beim Übergiessen mit Säuren werden die Krystalle sofort undurchsichtig (Kossel).

2. Sublimiert bei  $220^\circ$  unzersetzt zu einem rein weissen federähnlichen Aggregat feiner Nadeln, bei  $250^\circ$  unter teilweiser Zersetzung; schmilzt bei  $278^\circ$  noch nicht. Schmelzpunkt unter Gasentwicklung  $360\text{—}365^\circ$  <sup>5)</sup>.

3. Löst sich in 1086 Teilen kalten Wassers, leicht in heissem. Die Lösung reagiert neutral. Unlöslich in Äther und in Chloroform, etwas löslich in heissem Alkohol; in unreinem Zustand löst es sich schon in kaltem Alkohol. Löst sich in Säuren, auch in Eisessig (Kossel). Sehr leicht löslich in den Alkalihydraten, auch in Ammoniak, in diesem aber schwieriger als das Hypoxanthin. Bei der Digestion mit sehr verdünntem Ammoniak auf dem Wasserbade geht es völlig in Lösung, kann aber danach wieder teilweise ausfallen. Aus den alkalischen Lösungen wird es beim Neutralisieren mit Essigsäure oder beim Einleiten von Kohlensäure abgeschieden. In kohlensaurem Natron löst es sich nur wenig, fällt aber bei der Übersättigung seiner Lösung mit kohlensaurem Natron nur sehr langsam aus (zuweilen erst nach 48 Stunden).

Das Adenin wird in schwefelsaurer Lösung zum Unterschiede von Xanthin, Guanin und Harnsäure in der Hitze von Tierkohle nicht adsorbiert <sup>6)</sup>. Es geht scharf in die Hypoxanthinfraktion von Krüger und Salomon und bleibt auch nach dem völligen Abdampfen des Ammoniaks in Lösung <sup>7)</sup>.

4. Verbindungen a) mit Basen. Adeninblei, nach dem Trocknen bei  $130^\circ$   $\text{C}_5\text{H}_3\text{PbN}_5$ , erhält man nach Krüger <sup>7)</sup> in mikroskopischen, nadelförmigen, glanzlosen Krystallen, wenn man in eine Lösung von 1 Mol. Bleiacetat eine Lösung von 1 Mol. A. in 2 Mol. Natriumhydrat eingiesst. Sehr schwer löslich in Wasser, löslich in überschüssigem Bleiacetat. Mit Bleizucker, Bleiessig oder Bleiacetat und Ammoniak gibt das Adenin keinen Niederschlag. — Eine wässrige A.-Lösung gibt mit Kupfersulfat einen amorphen graublauen Niederschlag, der sich in

<sup>1)</sup> Levene und Jacobs, B. B. 42. 2703. 1909.

<sup>2)</sup> Minkowski, Arch. f. exp. Path. u. Pharm. 41. 406. 1898; Nikolaier, Zeitschr. f. klin. Med. 45. 359. 1902. — Schittenhelm, Arch. f. exp. Path. u. Pharm. 47. 432. 1902. — Ebstein und Bendix, Virchows Arch. 178. 464. 1904.

<sup>3)</sup> Kossel, Zeitschr. f. physiol. Ch. 10. 250. 1886; 12. 241. 1888; 18. 1. 1891.

<sup>4)</sup> M. Krüger, Zeitschr. f. physiol. Ch. 18. 430. 1894.

<sup>5)</sup> E. Fischer, B. B. 30. 2226. 1897.

<sup>6)</sup> F. Barnett und W. Jones, Journ. of biol. Chem. 9. 93. 1911.

<sup>7)</sup> M. Krüger, Zeitschr. f. physiol. Ch. 18. 430. 1894.



Alkalihydrat hellblau löst; die Lösung scheidet beim Erwärmen allmählich Kupferoxyd ab. Der Niederschlag enthält auf 1 Mol. Schwefelsäure 2 At. Kupfer und ist als ein Gemenge von Adeninkupfer mit Adeninkupfersulfat anzusehen (Krüger<sup>1)</sup>). — Adeninkupferoxydul. Die Verbindung entsteht in Gegenwart von Kupfersulfat sowohl durch Bisulfit als Thiosulfat langsam schon in der Kälte, sofort in der Wärme, selbst bei einer Verdünnung von 1:65 000 in wenig Sekunden. Der mit Sulfit entstandene Niederschlag enthält noch 0,5 Mol. Schwefelsäure gebunden (Krüger<sup>2)</sup>). Löst sich erst in 200 000 Teilen Wasser (Krüger und Wulff<sup>3</sup>). Adenin-Silber  $C_5H_4AgN_5$  und  $C_5H_3Ag_2N_5 \cdot H_2O$  erhält man, ausser durch die Digestion des A.-Silbernitrats mit Ammoniak nach Kossel<sup>4</sup>), auch bei der Fällung einer ammoniakalischen Adenininlösung mit Silbernitrat in der Siedehitze; der Gehalt an Silber ist von der Menge des verwendeten Silber-salzes abhängig. Auch wenn man die Lösung mit Silbernitrat vollständig ausfällt, entsteht nach Bruhns<sup>5</sup>) das Gemenge. Durch ammoniakalische Silberlösung wird aber das A. so gut wie vollständig abgeschieden; der Niederschlag löst sich auch bei Siedehitze nur schwer in Ammoniak.

b) Mit Säuren. Die Lösungen der Verbindungen mit Säuren reagieren gegen Lackmus sauer (Bruhns<sup>6</sup>). Das Chlorid  $C_5H_5N_5 \cdot HCl$ , +  $\frac{1}{2}H_2O$  bildet kurze dicke stark glänzende Prismen mit gebrochenen Endflächen, die schiefe Kante bildet mit der langen Seite des Prismas oft einen Winkel von  $137^\circ$  (Kossel); tritt auch in knolligen Aggregaten auf. Löst sich in 41,9 Teilen kaltem Wasser. — Chloroplatinat. Verdünnte Lösungen setzen in der Kälte nach einiger Zeit kleine gelbe Nadeln  $(C_5H_5N_5 \cdot HCl)_2PtCl_4$  ab; eine konzentrierte Lösung dieses Salzes liefert bei längerem Kochen ein in Wasser sehr wenig lösliches hellgelbes Pulver  $C_5H_5N_5 \cdot HCl \cdot PtCl_4$  (Kossel). — Das Chloraurat  $C_5H_5N_5 \cdot HCl \cdot HAuCl_4 \cdot H_2O$  wird nach Wulff<sup>7</sup>) beim Vermischen einer konzentrierten Adeninchloridlösung mit Goldchlorid sogleich, oder aus verdünnter Lösung beim Eindampfen in wohl ausgebildeten makroskopischen kurzen dicken glasglänzenden orangefarbenen vierseitigen Prismen mit vierflächiger Zuspitzung erhalten. Das Chloraurat zersetzt sich unter Gasentwicklung bei  $215-216^\circ$ . Das Adenin bildet noch ein zweites Chloraurat, vermutlich  $C_5H_5N_5 \cdot HAuCl_4 \cdot xH_2O$ ; dieses scheidet sich aus der konzentrierten salzsauren Lösung auf Zusatz von Goldchlorid sofort in gelben nadelförmigen Prismen ab und ist bis  $250^\circ$  beständig. — Nitrat  $C_5H_5N_5 \cdot HNO_3 + \frac{1}{2}H_2O$ , sternförmig gruppierte Nadeln, in unreinem Zustande grosse Knollen, löst sich in 110,6 Teilen kaltem Wasser. — Das Sulfat  $(C_5H_5N_5)_2H_2SO_4 + 2H_2O$ , krystallisiert in zwei verschiedenen Formen, löst sich in 153 Teilen kaltem Wasser, leicht in heissem. Das Chlorid und das Sulfat lassen sich aus Wasser unzersetzt umkrystallisieren. Das Sulfat scheidet sich mit  $2H_2O$  in tafelförmigen Krystallen aus der mit Ammonsulfat versetzten konzentrierten Lösung des Chlorids langsam ab. — Pyrochromat  $(C_5H_5N_5)_2H_2Cr_2O_7$ . Aus der heiss bereiteten Lösung von A. in überschüssiger wässriger Chromsäurelösung scheiden sich beim Erkalten gelbrote sechsseitige Tafeln ab. Schwer in kaltem, leicht in heissem Wasser löslich. Verglimmt auf dem Platinblech unter Funkensprühen (Bruhns, Krüger<sup>8</sup>). — Metaphosphat  $C_5H_5N_5 \cdot HPO_3$ . Selbst eine sehr verdünnte kalt gesättigte Adenininlösung gibt nach Wulff<sup>9</sup>) mit Metaphosphorsäure einen aus äusserst feinen Körnchen oder Häutchen bestehenden Niederschlag. Leicht löslich in Alkalihydrat, auch in Ammoniak und in Natriumphosphat, sowie in verdünnten Säuren, auch in Metaphosphorsäure. — Chloracetat  $C_5H_5N_5(CH_2Cl-COOH)_2$  krystallisiert

<sup>1)</sup> Krüger, a. a. O. 16. 165.

<sup>2)</sup> Krüger, a. a. O. 18. 353 u. 355; 20. 170.

<sup>3)</sup> Krüger und Wulff, Zeitschr. f. physiol. Ch. 20. 184.

<sup>4)</sup> Kossel, ebenda 12. 248.

<sup>5)</sup> G. Bruhns, Zeitschr. f. physiol. Ch. 14. 540.

<sup>6)</sup> Bruhns, ebenda.

<sup>7)</sup> C. Wulff, Zeitschr. f. physiol. Ch. 17. 507.

<sup>8)</sup> Bruhns, a. a. O. 16. 12; — Krüger, a. a. O. 16. 165.

<sup>9)</sup> Wulff, a. a. O. 506 u. 500.

nach Krüger<sup>1)</sup> aus der heissen wässrigen Lösung von Adenin und Chloressigsäure in rechtwinkligen Plättchen und vierseitigen zu Sternen vereinigten Prismen. Entsteht auch beim Zusammenschmelzen von A. mit Chloressigsäure auf dem Wasserbade. In Wasser und heissem verdünnten Alkohol leicht, in kaltem Alkohol schwer löslich. Schmilzt bei 162—163° unter Entwicklung von Salzsäure zu einer gelbroten Flüssigkeit. — Oxalat  $C_5H_5N_5, C_2H_2O_4 + 2H_2O$ . Eine Lösung von Adenin in heisser verdünnter Oxalsäure scheidet beim Erkalten lange feine Nadeln in voluminösen Massen ab; aus sehr verdünnten Lösungen erfolgt die Abscheidung oft erst nach 8—14 Tagen. Das Salz hat nicht immer die angegebene Zusammensetzung. Die Oxalate des Guanins, Xanthins und Hypoxanthins sind leichter löslich und haben ein anderes Aussehen (Kossel). — Pikrat  $C_5H_5N_5, C_6H_2(NO_2)_3OH + H_2O$ . Salzsäures Adenin wird nach Bruhns<sup>2)</sup> durch Natriumpikrat, freies A. durch Pikrinsäure als Pikrat gefällt. Der flockige hellgelbe Niederschlag löst sich ziemlich gut in kochendem Wasser, beim Erkalten krystallisieren sehr voluminöse Büschel mikroskopisch feiner gelber Nadeln. Die hellgelbe Farbe unterscheidet dieses Salz fast von allen Pikraten der Xanthinbasen, namentlich vom Guanin-pikrat. Das Salz zersetzt sich nicht mit Wasser und lässt sich auswaschen (Wulff). Nach dem Trocknen wollige seidengänzende Masse. Verliert bei 100° schnell Glanz und Krystallwasser, verträgt aber Erhitzen bis 220°. Das Pikrat fällt aus heisser wässriger Lösung wasserfrei in makroskopischen dunkelgelben Prismen. Es zersetzt sich unter Gasentwicklung bei 279—281°. Verbrennt träge, ohne Verpuffung, unter Hinterlassung von viel Kohle. Löst sich bei 15—20° in 3500 Teilen kaltem Wasser, in heissem Wasser aber und in Alkohol von 96 % bedeutend leichter. Löst sich auch in der äquivalenten Menge Natriumhydrat, etwas weniger leicht in Natriumcarbonat, leicht auch in Natriumphosphat; wegen der Löslichkeit in Lauge gibt A. auch bei grösserer Konzentration mit Natriumpikrat keinen Niederschlag. Verdünnte Säuren lösen das Salz kaum. Eine kalt gesättigte Adeninlösung gibt mit kalt gesättigter Pikrinsäure sofort einen Niederschlag und selbst bei 5—8facher Verdünnung treten die Nadeln noch binnen einer Minute auf. Eine kalt gesättigte Lösung des Salzes scheidet auf Zusatz von 0,1 Volum konzentrierter Natriumpikratlösung in wenig Minuten noch  $\frac{5}{7}$  des Salzes ab und die Löslichkeit ist dann auf 1:13750 gesunken. Es fällt mit Natriumpikrat noch in einer Verdünnung von 1:13000<sup>3)</sup>. Aus dem Pikrat kann man die Basis gewinnen durch Zerlegen des Salzes mit starker Salzsäure und Ausschütteln der Pikrinsäure mit Äther. Zur Isolierung des Adenins aus dem Pikrat schlägt Jones vor<sup>4)</sup>: Lösen in 10 % Ammoniak, verdünnen zu 0,5 % Adeningehalt und Fällen mit ammoniakalischer Chlorsilberlösung. Der grösste Teil der Pikrinsäure bleibt im Filtrat. Der gewaschene Niederschlag wird in heissem Wasser mit Salzsäure zerlegt. Beim Abkühlen fällt eine geringe Menge von Adeninpikrat aus, weil auch ein Teil der Pikrinsäure als Silbersalz mitgefällt wird. Die Adeninchloridlösung wird nun mit kleinen Portionen Äther ausgeschüttelt, mit Soda neutralisiert und mit Kupfersulfat-Bisulfit gefällt. Die Fällung wird nach dem Waschen mit Schwefelwasserstoff zerlegt. Das erhaltene Adenin wird aus 5 % Schwefelsäure umkrystallisiert. Die Ausbeuten sind selbst nach zweimaligem Umkrystallisieren nahezu quantitativ<sup>5)</sup>. — Silberpikrat  $C_5H_4AgN_5, C_6H_2(NO_2)_3OH + H_2O$ . Eine kalte wässrige Lösung von Adeninpikrat gibt nach Bruhns l. c. mit Silbernitrat sofort einen amorphen voluminösen gelben Niederschlag; bei Übershuss von Silbersalz bleibt kein A. in Lösung. Fällt man eine siedende Lösung in derselben Weise, so wird der Niederschlag bald krystallinisch. Der amorphe Niederschlag enthält kein Krystallwasser. Ammoniak entzieht der Verbindung Pikrinsäure, unter Hinterlassung von Adeninsilber. — Pikrolonat  $C_5H_5N_5, C_{10}H_8N_4O_5$ . Durch Füllen mit alkoholischer Pikrolonsäurelösung, lässt sich aus heissem Wasser umkrystal-

<sup>1)</sup> Krüger, a. a. O. 16. 166.

<sup>2)</sup> Bruhns, a. a. O. 14. 536.

<sup>3)</sup> Bruhns, a. a. O. 556.

<sup>4)</sup> Barnett und Jones, Journ. of biol. Chem. 9. 93. 1911.

<sup>5)</sup> Barnett und Jones, J. of biol. Ch. 9. 93. 1911.

lisieren. Schmelzpunkt  $265^{\circ}$  1). — Quecksilberpikrat ( $C_5H_4N_5)_2Hg + 2C_6H_5(NO_2)_3OH$  mit  $H_2O$  und  $2H_2O$ , fällt als körnig krystallinischer, aus Nadeln bestehender Niederschlag, wenn man eine heisse konzentrierte wässrige Lösung von Adeninpikrat mit Natriumpikrat und Quecksilberchlorid versetzt; das Natriumpikrat bindet die frei werdende Salzsäure, in welcher sich der Niederschlag ziemlich leicht löst. Die Fällung ist keine quantitative. In der Kälte scheint unter gleichen Umständen derselbe Niederschlag zu entstehen (Bruhns<sup>2</sup>). — Eine halbprozentige A.-Lösung gibt nach Krüger<sup>3</sup>) mit Ferro- oder Ferricyankalium auch nach längerem Stehen keinen Niederschlag; Essigsäure scheidet aber aus der mit dem Ferrosalz versetzten Lösung dünne Plättchen, aus der Ferrisalz enthaltenden hellbraune, zu Drusen vereinigte, zweiflächig zugespitzte Krystalle ab.

c) Mit Salzen. Cadmiumchlorid gibt einen Niederschlag, der sich in der Wärme löst und beim Erkalten wieder erscheint; leicht löslich in Ammoniak. — Alkoholische Chlorzinklösung erzeugt einen in Ammoniak löslichen Niederschlag. Behandelt man Adenin mit Zink und Salzsäure in der Kälte und lässt die Lösung über Kali stehen, so scheiden sich Krystalle aus, die sich in Wasser lösen; nach kurzer Zeit setzt diese Lösung schwer lösliche Krystalle von Adenin-Chlorzink ab. Die Krystalle hinterlassen beim Abdampfen mit Salpetersäure einen gelben Rückstand, der beim Erhitzen mit Natronlauge intensiv gelb wird. Reines Adenin gibt auch bei Gegenwart von Chlorzink diese Reaktion nicht. Das Doppelsalz bildet sich nicht aus salzsaurem Adenin und Chlorzink. — Quecksilberchlorid und Quecksilbernitrat geben im heissen Wasser unlösliche, in Salzsäure leicht lösliche Niederschläge (Kossel). Eine Verbindung  $C_5H_4N_5 \cdot Hg \cdot Cl$  entsteht als weisser feinkörniger Niederschlag, wenn man eine siedende wässrige Adeninelösung allmählich mit konzentrierter Sublimatlösung versetzt (Bruhns<sup>4</sup>); die bei der Bildung des Salzes frei werdende Salzsäure hält solches Salz in Lösung, das durch Neutralisieren mit Soda abgeschieden werden kann (Krüger<sup>5</sup>). Ammoniakwasser entzieht der Verbindung Chlor und verwandelt sie vielleicht in  $C_5H_4N_5 \cdot Hg \cdot OH$ . Bei der Fällung der siedenden Lösung mit viel überschüssigem Quecksilberchlorid und der zur Lösung nötigen Menge Salzsäure, oder bei der Fällung in der Kälte entsteht eine Verbindung  $C_5H_4N_5 \cdot HgCl + HgCl_2$ . Fällt man in Gegenwart von viel Salzsäure, so entstehen Doppelsalze von salzsaurem Adenin mit 1–6 Mol.  $HgCl_2$ , die beim Kochen mit Wasser zu  $C_5H_4N_5 \cdot Hg \cdot Cl + HgCl_2$  werden (Bruhns). — Adeninequecksilbercyanid ( $C_5H_5N_5)_2Hg(CN)_2$  krystallisiert nach Bruhns<sup>6</sup>) aus einer heissen Lösung von Adenin und Quecksilbercyanid in sternförmig gruppierten Nadeln und Plättchen. — Jodwismut-Adenin  $C_5H_5N_5$ , HJ,  $2BiJ_3$ ,  $H_2O$ ; entsteht nach Bruhns<sup>7</sup>) bei Zusatz von Jodwasserstoff enthaltender Jodwismutkaliumlösung zu einer wässrigen Adeninelösung als Niederschlag glänzender hellroter Nadeln. Zersetzt sich mit viel Wasser zu rotgelben amorphen Flocken, wird beim Trocknen an der Luft tiefrot, bei  $100^{\circ}$  braunrot. — Salpetersaures Adenin-Silber,  $C_5H_5N_5$ ,  $AgNO_3$ , krystallisiert aus der Lösung in heisser Salpetersäure von 1,1 Dichte beim Erkalten in mehrere Millimeter langen Krystallen, die sich beim Auswaschen mit Wasser anscheinend unter Verlust von Salpetersäure, beim Auswaschen mit verdünnter Salpetersäure unter Verlust von Silber zersetzen (Kossel<sup>8</sup>). Nach Bruhns<sup>9</sup>) erhält man beim Füllen von A. mit Silbernitrat immer Gemenge von Verbindungen mit 1 und mit 2  $AgNO_3$ ; der Niederschlag enthält um so mehr Silber (bis 39,8 %), je mehr Silbernitrat bei der Fällung oder Krystallisation zugegen war, aber auch bei Überschuss an A. in der Lösung enthält die Verbindung nicht weniger als 36,7 % (statt 35,4). Das

1) P. A. Levene, Biochem. Zeitschr. 4. 320. 1907.

2) Bruhns, a. a. O. 571.

3) Krüger, Zeitschr. f. physiol. Ch. 16. 165.

4) Bruhns, a. a. O. 567.

5) Krüger, a. a. O. 18. 431.

6) Bruhns, a. a. O. 573.

7) Bruhns, a. a. O. 574.

8) Kossel, Zeitschr. f. physiol. Ch. 10. 257.

9) Bruhns, a. a. O. 552.



Waschwasser reagiert auf Lackmus sehr lange sauer und enthält auch Silber. In einem mit Salpetersäure gewaschenen Salz fand Kossel nur 27,99 % Ag. In Salpetersäure von 1,1 Dichte löst es sich, bei Gegenwart von überschüssigem Silbernitrat, ungefähr ebenso wenig, wie die Hypoxanthinverbindung. Bei der Behandlung dieser Salze mit Ammoniak erhält man Gemenge von  $C_5H_4AgN_5$  und  $C_5H_3Ag_2N_5$ ; werden sie mit nur mässigen Mengen Ammoniak behandelt, so geht Adenin nicht merklich in Lösung.

d) Adenin gibt auch Verbindungen mit anderen Purinen. Adenin-Hypoxanthin  $C_5H_5N_5 \cdot C_5H_4N_4O$  scheidet sich nach Bruhns<sup>1)</sup> aus der heissen Lösung gleicher Gewichtsteile beider Basen beim Erkalten als kleisterähnliche durchscheinende Masse aus, die bei längerem Verweilen in der Flüssigkeit zum Teil kreideweiss wird. Löst sich in warmem Wasser ziemlich gut und schneller als gleichzeitig ausgeschiedenes A. Aus der Lösung in starkem Ammoniak krystallisiert die Verbindung mit  $3H_2O$  in perlenartigen Aggregaten sehr kleiner radial gestellter Nadeln. Bildet ein einheitliches Chlorhydrat, das aber mit Goldchlorid sofort Adeninchlorgold liefert. Aus der Lösung des Sulfats und Nitrats krystallisiert zuerst das (schwerer lösliche) Adeninsalz. Die Basen lassen sich auch durch Pikrinsäure trennen. — Adenin-Theobromin,  $C_5H_5N_5 \cdot C_7H_8N_4O_2 + 4\frac{1}{2}H_2O$ . Aus einer heissen wässerigen Lösung von Theobromin mit mehr als 1 Mol. Adenin krystallisiert nach Krüger<sup>2)</sup> die Verbindung in langen sehr feinen seidenglänzenden Prismen. Leicht löslich in heissem Wasser, schwerer in kaltem. Zersetzt sich teilweise beim Umkrystallisieren aus Wasser unter Ausscheidung von Theobromin. Pikrinsäure fällt aus der Lösung Adeninpikrat.

e) Die  $NH_2$ -Gruppe des Adenins lässt sich acetylieren und benzoyleieren, die freien H-Atome sind leicht durch Alkyle, Aryle und Halogene zu ersetzen. Das N-Atom an Stelle 7 reagiert mit Diazokörpern, in dem das H-Atom als Wasser abgespalten wird, unter Bildung einer Diazoamidoverbindung<sup>3)</sup>. Diazobenzolsulfosäure-Adenin  $C_5H_4N_4N \cdot N=N-C_6H_4SO_3H$ . Braunrote Krystalle, bei 270° noch nicht geschmolzen, wenig löslich in Alkohol und Äther, löslich in kaltem Wasser und Alkalien. Heisses Wasser zersetzt. Ein Überschuss von Lauge ist schädlich. Man löst 5 g Adenin in 74 cem N-Lauge, d. i. auf ein Mol. Adenin 2 Mol. Natriumhydrat und mischt unter Eiskühlung mit einer Aufschwemmung von 6,8 g Diazobenzolsulfosäure in 50 cem Wasser, hierauf setzt man 36,5 N-Schwefelsäure zu, sodass nur ein Mol. Natriumhydroxyd zurückbleibt und giesst in 75 cem 20 %ige Schwefelsäure ein. Die entstandene braune Fällung wird in einer Mischung von 50 g Schwefelsäure und 18 Wasser gelöst und in 300 cem Wasser eingegossen. Nun krystallisiert die Verbindung aus<sup>3)</sup>.

5. Zersetzungen. Adenin kann nach Kossel<sup>4)</sup> stundenlang mit Barytwasser, Kalilauge oder Salzsäure gekocht werden, ohne angegriffen zu werden. Bei Temperaturen über 100° erfolgt völlige Zersetzung. Beim Erhitzen mit rauchender Salzsäure auf 180—200° zerfällt es nach Krüger<sup>5)</sup> in Glykokoll, Ammoniak, Kohlensäure und Ameisensäure nach der Gleichung  $C_5H_5N_5 + 8H_2O = C_2H_5NO_2 + 4NH_3 + CO_2 + 2H.COOH$ . Wird es mit festem Kaliumhydrat auf 200° erhitzt, so liefert es reichlich Blausäure. Beim Kochen mit Permanganat erweist es sich nach Krüger<sup>6)</sup> sehr beständig, wird aber nach Kossel bei starker Oxydationswirkung zerstört. Selbst bei langdauerndem Kochen mit Chromsäure erleidet es keine Veränderung (Krüger<sup>7)</sup>. Brom führt (trockenes) Adenin nach Krüger<sup>8)</sup> in bromwasserstoffsäures Bromadenin  $C_5H_4BrN_5$ , HBr über. — Salpetrige Säure verwandelt es in Hypoxanthin (Kossel, Krüger<sup>9)</sup>); selbst grössere Mengen Harnstoff neben wenig salpetriger

<sup>1)</sup> Bruhns, a. a. O. 561.

<sup>2)</sup> Krüger, Zeitschr. f. physiol. Ch. 21. 277.

<sup>3)</sup> R. Burian, Zeitschr. f. ph. Ch. 51. 425. 1907.

<sup>4)</sup> Zeitschr. f. ph. Ch. 12. 248.

<sup>5)</sup> Krüger, Zeitschr. f. physiol. Ch. 16. 167.

<sup>6)</sup> Krüger, a. a. O. 19. 425.

<sup>7)</sup> Krüger, a. a. O. 18. 166.

<sup>8)</sup> Krüger, a. a. O. 16. 330.

<sup>9)</sup> Kossel, a. a. O. 10. 258. — Krüger, Zeitschr. f. physiol. Ch. 18. 444.



Säure hindern diese Zersetzung nicht völlig (Krüger <sup>1</sup>). Durch Natriumamalgam sowie durch Kochen mit Zinnchlorür wird das Adenin nach Kossel nur sehr langsam oder gar nicht angegriffen. Durch Bakterien und Fermente (S. 940) wird es zunächst in Hypoxanthin umgewandelt und dann weiter vollständig zerstört.

**Darstellung.** Am besten erfolgt die Darstellung aus der Teelauge. Die Mutterlaugen von der Kaffeendarstellung werden mit Kupfersulfat und Bisulfit in der Hitze gefällt, die Fällung gut gewaschen, mit Schwefelwasserstoff zerlegt und das abgeschiedene Adenin aus 5%iger Schwefelsäure umkrystallisiert <sup>2</sup>).

#### Nachweis.

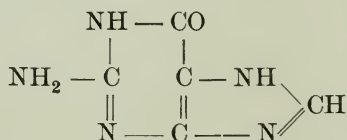
a) Durch Zink und verdünnte Salzsäure wird das Adenin in einen Körper übergeführt, der in neutraler oder alkalischer Lösung unter Aufnahme von Sauerstoff rot oder braunrot wird. Dieses der Azulminsäure ähnliche Produkt gibt mit konzentrierten Säuren leicht grün und braun schillernde Lösungen; auch in Ammoniak und den fixen Alkalien löst es sich leicht (Kosselsche Probe). Die zu untersuchende Probe wird mit Zink und Salzsäure  $\frac{1}{2}$  Stunde auf dem Wasserbade erwärmt, es entsteht eine purpurrote Färbung <sup>3</sup>), die beim Verdünnen mit Wasser und Übersättigen mit Natronlauge in rot und rotbraun übergeht (Unterschied von Guanin und Caffein). Hypoxanthin gibt dieselbe Reaktion.

b) Eine halbprozentige wässrige Adenininlösung wird durch Eisenchlorid stark rot, beim nachfolgenden Kochen aber nicht verändert (Krüger <sup>4</sup>).

Dampft man A. mit verdünnter oder rauchender Salpetersäure auf dem Wasserbade ein, so bleibt ein weisser oder gelblicher Rückstand, der sich weder mit Ammoniak noch mit Kalilauge oder Bariumhydrat färbt (Kossel, Bruhns <sup>5</sup>), auch die Weidelsche Probe gibt es nicht (Kossel).

#### 2. Guanin.

2-Amino-6-Oxypurin.  $C_5H_5N_5O$ . Mol.-Gew. 151,08. C = 39,73 %; H = 3,31 %; N = 46,35 %; O = 10,61 %.



Das Guanin wurde von Unger im Jahre 1845 im Guano entdeckt <sup>6</sup>).

<sup>1</sup>) Krüger, a. a. O. 21. 274.

<sup>2</sup>) Krüger, Zeitschr. f. ph. Ch. 16. 161. 1892; 18. 423. 1894; 21. 274. 1895/96.

<sup>3</sup>) Kossel, Zeitschr. f. ph. Ch. 12. 241. 1888. E. Fischer B. B. 30. 2226. 1897.

<sup>4</sup>) Zeitschr. f. ph. Ch. 21. l. c.

<sup>5</sup>) Kossel, a. a. O. 10. 255. — Bruhns, a. a. O. 14. 539.

<sup>6</sup>) Liebig's Ann. 51. 395. 1844; 58. 18. 1846; 59. 58. 1848; Poggendorffs Ann. 65. 222. 1845. — Gorup-Besanez und Will, Ann. d. Ch. u. Pharm. 69. 117. 1849.

Vorkommen: Gebunden in der Nucleinsäure, frei in den Exkrementen der Kreuzspinne<sup>1)</sup>, im Knorpel, in den Muskeln und Ligamenten<sup>2)</sup>, in der Hefe<sup>3)</sup>, in der Leber<sup>4)</sup>, in der Haut von Amphibien und Reptilien<sup>5)</sup>, in den Schuppen und Schwimmblasen der Fische<sup>6)</sup>, im Auge der Fische<sup>7)</sup>, in den menschlichen Fäces<sup>8)</sup>, in der Heringslake<sup>9)</sup>, im Harn und in den Organen des Schweines bei der Guaningicht<sup>10)</sup>, im menschlichen Harn namentlich bei Fieber und Nervenaffektionen (Pouchet, Baginsky<sup>11)</sup>). Im normalen Schweineharn scheint es zu fehlen (Schittenhelm), wurde aber von Pecile und von Salomon gefunden<sup>12)</sup>.

Synthesen: Nach Fischer<sup>13)</sup>. Aus Trichlorpurin entsteht beim Erhitzen mit Alkali 6-Oxy-2-8-dichlorpurin. Dieses geht mit alkoholischem Ammoniak in Chlorguanin über, welches durch HJ reduziert Guanin liefert. Nach Traube<sup>14)</sup>. Cyanessigsäureäthylester und Guanidin gehen beim Stehen mit Alkali in 2-4-Diamino-6-oxypyrimidin über, dieses liefert mit salpetriger Säure ein Isonitrosoderivat, welches durch Schwefelammon reduziert 2-4-5-Triamino-6-oxypyrimidin ergibt. Die mit Ameisensäure hieraus erhaltene Formylverbindung verwandelt sich beim Erhitzen in Guanin.

#### Eigenschaften:

1. Aus seinen konzentrierten sauren oder alkalischen Lösungen fällt es beim Übersättigen amorph aus. Krystallisiert erhält man es nach Horbaczewski<sup>15)</sup>, wenn man eine alkalische heisse sehr verdünnte Lösung (1 : 2000) mit  $\frac{1}{3}$  Vol. Alkohol vermischt und darauf mit Essigsäure übersättigt. Die Krystalle bestehen aus kugeligen oder garbenförmigen dichten, dem Kreatininchlorzink ähnlichen Aggregaten von Prismen und Pyramiden. Trocken stellen sie ein weisses mattes Krystallpulver dar. Aus einer ebenso verdünnten aber alkoholfreien Lösung fällt das Guanin nicht so schön krystallisiert aus. Abbildung nach Horbaczewski.

2. Das krystallisierte Guanin ist wie das amorphe wasserfrei. Unlöslich in Wasser. Wenig löslich in Ammoniak, reichlicher in der Wärme als in der Kälte;

<sup>1)</sup> Lieb. Ann. **51**. 395. 1844; **58**. 18. 1846; **59**. 58. 1846; Poggendorffs Ann. **65**. 222. 1845. — Gorup-Besanez und Will, Ann. d. Ch. u. Pharm. **69**. 117. 1849.

<sup>2)</sup> Virchows Jahresber. über die Fortschritte der Ch. **19**. 721, 1866; Virchows Arch. **35**. 358. **36**. 147. 1866.

<sup>3)</sup> A. Kossel, Zeitschr. f. ph. Ch. **6**. 431. 1882.

<sup>4)</sup> A. Kossel, ebenda, **7**. 19. 1882/83; **8**. 406. 1883/84.

<sup>5)</sup> Ewald und Krukenberg, Zeitschr. f. Biol. **1**. 154. 1883.

<sup>6)</sup> Voit, Zeitschr. f. wiss. Zool. **15**. 515. 1865. — Bethé, Zeitschr. f. ph. Ch. **20**. 472. 1895.

<sup>7)</sup> Kühne und Sewall, Untersuch. a. d. phys. Inst. Heidelberg **3**. 223. 1880.

<sup>8)</sup> Krüger und Schittenhelm, Zeitschr. f. ph. Ch. **35**. 158. 1902.

<sup>9)</sup> Isaac, Hofmeisters Beitr. z. ch. Phys. u. Path. **5**. 500. 1904.

<sup>10)</sup> Virchow, l. c. — Pecile, Ann. d. Ch. u. Pharm. **183**. 141. 1876.

<sup>11)</sup> Contrib. à la connaiss. des matieres extract. de l'urine. Thèse Paris 1880. — Baginsky, Zeitschr. f. ph. Ch. **8**. 397.

<sup>12)</sup> Pecile, l. c. — Salomon, Du Bois Arch. 1884. 175. — Virch. Arch. **95**. 527.

<sup>13)</sup> B. B. **30**. 1116. 1897.

<sup>14)</sup> B. B. **33**. 1371. 1900.

<sup>15)</sup> Horbaczewski, Zeitschr. f. physiol. Ch. **23**. 229. 1897.

nach Wulff bleiben in 100 ccm 1 %igem Ammoniak 9 mg Guanin gelöst, in 100 ccm 3 %igem Ammoniak 15 mg, in 5 %igem 19 mg. Unlöslich in Piperazininlösung (Salkowski<sup>1)</sup>). Leicht löslich in Alkalihydrat. Auch löslich in konzentrierten Mineralsäuren, jedoch nur bei grossem Überschuss derselben, dagegen nicht in Ameisensäure und in Essigsäure (Neubauer und Kerner) oder anderen organischen Säuren.

3. Verbindungen a. mit Basen. Aus einer bei 30—35° bereiteten Lösung von Guanin in konzentriertem Ammoniak setzen sich nach Drechsel beim freiwilligen Verdunsten mehr oder minder deutliche, anscheinend rhombische Tafeln und Nadeln ab. Bei der Digestion von Guanin mit Ammoniak erhielt



Fig. 43.

Kossel eine bei 110° beständige Verbindung von Guanin-Ammoniak  $C_5H_5N_5O \cdot NH_3$ . — Der Verbindung mit Natron erteilt Unger die Formel  $C_5H_5N_5O, Na_2O, 3H_2O$ ; sie wird durch Kohlensäure und schon durch Wasser zerersetzt und löst sich nach Salomon<sup>2)</sup> im Gegensatz zu den Natriumverbindungen des Hetero- und Paraxanthins in konzentrierter Lauge. Eine Lösung von Guanin in Lauge gibt mit Salmiak sofort einen Niederschlag, sobald das Alkalihydrat durch den Salmiak übersättigt ist (Huppert). — In Gegenwart von Kupfersulfat wird das Guanin durch Bisulfit in der Kälte und in der Wärme, durch Thiosulfat in der Kälte sofort als Kupferoxydulverbindung gefällt (Krüger<sup>3)</sup>).

b) Mit Säuren. Aus der Lösung des Guanins in verdünnter Salzsäure krystallisiert das Chlorid  $C_5H_5N_5O, HCl + 2H_2O$  (Scherer) in makroskopischen, feinen langen, vierseitigen, strahlenförmig angeordneten Nadeln, die in Berührung mit Wasser sofort in Salzsäure und Guanin zerfallen, verliert in höherer Temperatur die Salzsäure vollständig (Wulff). — Das Chlorplatinat  $C_5H_5N_5O, HCl, PtCl_4$  (?) bildet pomeranzengelbe schwer lösliche Nadeln. — Ein Aurochlorid wie das Adenin gibt das Guanin nach Kossel und nach Wulff nicht. — Das Nitrat  $C_5H_5N_5O, HNO_3 + 1\frac{1}{2}H_2O$  krystallisiert aus der heissen Lösung von Guanin in verdünnter Salpetersäure beim Erkalten in langen, sehr feinen haarförmigen, verfilzten Nadeln (Unger), beim Verdunsten der Lösung in schönen sechs-eitigen Plättchen (Pecile) oder in vier- und sechsflächigen Prismen (Kossel). — Das Sulfat  $C_5H_5N_5O, H_2SO_4 + H_2O$  setzt sich aus der Lösung des Guanins in verdünnter heisser Schwefelsäure in oft Zentimeter langen Nadeln ab; zerlegt

<sup>1)</sup> C. Wulff, Zeitschr. f. physiol. Ch. **17**. 505. 1892. — Salkowski, Pflügers Arch. **56**. 349. 1894.

<sup>2)</sup> Drechsel, Journ. f. prakt. Ch. [2]. **24**. 44. 1881. — Kossel, Zeitschr. f. physiol. Ch. **7**. 17. 1882. — Unger, Ann. d. Ch. u. Pharm. **59**. 68. 1846. — Salomon, Virchows Arch. **125**. 559.

<sup>3)</sup> Krüger, Zeitschr. f. physiol. Ch. **18**. 354 u. 355.



sich mit Wasser. — Das Pyrochromat  $(C_5H_5N_5O)_2$ ,  $H_2Cr_2O_7$  scheidet sich aus einer Lösung von salzsaurem Guanin auf Zusatz von Kaliumpyrochromat langsam in glänzenden, orangefarbenen, mikroskopischen Prismen mit meist abgestumpften Endflächen aus, ebenso aus einer Lösung von Guanin in heisser Chromsäurelösung. Zersetzt sich mit Wasser, schneller in der Wärme. Verliert bei  $100^\circ$  (gegen  $\frac{1}{2}$  Mol.) Wasser. Zerstäubt auf dem Platinblech unter Funkensprühen (Capranica, Wulff). — Metaphosphat  $C_5H_5N_5O$ ,  $HPO_3$ . Wasserhaltig. Versetzt man nach Pohl salzsaures Guanin mit Natriummetaphosphat oder nach Liebermann<sup>1)</sup> eine Lösung von Guanin in Natronlauge mit Metaphosphorsäure, so wird die Flüssigkeit selbst bei äusserster Verdünnung der Guaninlösung sofort milchig und gibt nach längerer Zeit einen flockigen Niederschlag, der anfangs durchs Filter geht und es dann verstopft. Entsteht auch auf Zusatz von Metaphosphorsäure zu einer sauren Guaninlösung. Äusserst feine Häute. Mehr oder weniger krystallinisch fällt das Salz aus siedend heisser verdünnter Lösung. Leicht löslich in Alkalien, schwer, der Löslichkeit des Guanins entsprechend, in Ammoniak, beim Erwärmen löslich in verdünnter Säure. Die Lösung in Lauge gibt beim Übersättigen mit Säure solang einen Niederschlag des ursprünglichen Salzes, als die Metaphosphorsäure nicht in Orthophosphorsäure übergegangen ist. Konzentrierte Salzlösungen, namentlich Magnesiumsulfat lösen es in geringem Grade, sie verlangen daher die Abscheidung. Die Fällung ist in allen Fällen eine so vollständige, dass Pikrinsäure im Filtrat keinen, Silberlösung einen geringen Niederschlag gibt. Trocken weisses Pulver oder (die amorphe Verbindung) feste porzellanartige Masse. Verbrennt äusserst schwer unter Hinterlassung von viel Kohle (Wulff). — Pikrolonat  $C_5H_5N_7O \cdot 2(C_{10}H_8N_4O_5)^2$ . Beim Versetzen einer Lösung mit alkoholischer Pikrolonsäurelösung fällt zum Unterschiede vom Adenin kein Guanin aus, erst auf Zusatz von Natronlauge. — Pikrat  $C_5H_5N_5O \cdot C_6H_2(NO_2)_3OH + H_2O$  (Wulff). Kalt gesättigte Pikrinsäurelösung scheidet aus salzsaurem Guanin allmählich lockere orangegelbe Flocken, welche sich unter dem Mikroskop als pinsel- und farnkrautähnliche Bündel sehr feiner Nadeln erweisen, oder sparrige Drusen grosser Nadeln ab; aus Lösungen mit überschüssiger Salzsäure setzt sich zuerst Pikrinsäure ab (Capranica). Die Ausscheidung erfolgt noch bei einer Verdünnung von 1 : 30 000, aber erst nach längerer Zeit. Aus alkalischer Lösung fällt die Pikrinsäure das Guanin auf Zusatz von Essigsäure. Reichlich löslich in heissem Wasser; zersetzt sich in Berührung mit Wasser und mit Alkohol (Wulff). Lufttrocken goldgelb, verfilzt, seidenglänzend. Wird beim Erhitzen dunkler, fast orangerot, nimmt beim Erkalten die ursprüngliche Farbe wieder an. Verliert bei  $120^\circ$  mit dem Krystallwasser seinen Glanz und wird hellgelb, beginnt sich bei  $190^\circ$  zu zersetzen und verkohlt. Verbrennt mit Flamme unter Hinterlassung von viel Kohle (Wulff). — Silberpikrat  $C_5H_4AgN_5O$ ,  $C_6H_2(NO_2)_3OH + 1\frac{1}{2}H_2O$ . Eine siedend heisse verdünnte Pikratlösung (G. in Mineralsäure und überschüssiger Pikrinsäure) gibt mit Silbernitrat (bei Abwesenheit von Salzsäure) sofort einen zitronengelben, voluminösen, amorphen Niederschlag. In heissem Wasser sehr schwer löslich, in kaltem nahezu unlöslich. Wasser entzieht dem Salze etwas Pikrinsäure, Ammoniak leicht fast alle Pikrinsäure (Wulff). — Ferricyanwasserstoffsäures G.  $(C_5H_5N_5O)_4$ ,  $H_3Fe(CN)_6 + 8H_2O$  (Wulff). Ferricyankalium fällt aus salzsaurem G. in einiger Zeit mikroskopisch kleine, glänzende, gelbbraune, schwer lösliche Krystalle (Capranica), vier- oder sechsseitige Prismen mit zwei Endflächen, von denen die eine bedeutend grösser ist. Verliert das Krystallwasser langsam bei  $120^\circ$ — $130^\circ$  und wird dabei dunkelgrün (Wulff). — Ferrocyanwasserstoffsäures G. bildet fast farblose Krystalle (Wulff). — Nitrosoferri-cyanwasserstoffsäures G.  $(C_5H_5N_5O)_2 \cdot H_2(CN)_5NOFe + 1\frac{1}{2}H_2O$ . Salz-

<sup>1)</sup> Wulff, Zeitschr. f. physiol. Ch. 17. 479 u. 508. — Capranica, Zeitschr. f. physiol. Ch. 4. 233. 1880. — Wulff, a. a. O. 477. — Pohl, Zeitschr. f. physiol. Ch. 13. 296. — Liebermann, Zentralbl. f. d. med. Wiss. 1889. 226.

<sup>2)</sup> P. A. Levene, Biochem. Zeitschr. 4. 1907.

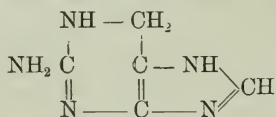


saures G. gibt mit Nitroprussidnatrium nach einiger Zeit ziemlich grosse glänzende, hellziegelrote Krystalle, mikroskopische vierseitige Säulen mit zugespitzten Enden (Wulff).

c) Mit Salzen. Guanin-Chlorzink  $(C_5H_5N_5O.HCl)_2ZnCl_2 + 3H_2O$ , entsteht nur beim Eintragen von salzsaurem Guanin in warmes sirupdickes Chlorzink. Weisses Krystallmehl oder schöne wasserhelle Krystalle, löslich in Salzsäure und Natronlauge, wenig in Wasser. — G.-Chlorcadmium, perlglänzende weisse, in Salzsäure und in Wasser lösliche Plättchen bei Versetzen von salzsaurem Guanin mit überschüssigem Chlorcadmium. — G.-Quecksilberchlorid  $C_5H_5N_5O, HgCl_2 + 2\frac{1}{2}H_2O$ , weisses Krystallmehl von mikroskopischen kurzen Prismen, beim Zusatz wässriger Sublimatlösung zu salzsaurem Guanin, leicht löslich in Säuren und in Cyankalium. Bei Verwendung alkoholischer Sublimatlösung fällt  $(C_5H_5N_5O.HCl)_2HgCl_2 + H_2O$  (Neubauer und Kerner). — Jodwismut-G.  $C_5H_5N_5O.HJ, 2BiJ_3 + 2H_2O$ . G. wird selbst aus sehr verdünnter, saurer (jodwasserstoffsaurer) Lösung durch Jodwismutkalium gefällt. Mikroskopisch feine, ziemlich lange rote Nadeln, lufttrocken lockere tiefrote Masse. In der warmen Mutterlauge löslich, zersetzt sich mit Wasser und färbt sich dabei ziegelrot. Wird schon unterhalb  $100^\circ$  unter Wasserverlust schwarzviolett (Wulff). — Salpetersaures Guaninsilber  $C_5H_5N_5O, AgNO_3$  fällt aus einer Lösung von Guanin in Salpetersäure auf Zusatz von Silbernitrat, löst sich in heisser salpetrigsäurefreier Salpetersäure von 1,1 Dichte nur wenig und fällt bald wieder krystallinisch aus; beim Kochen mit starker reiner Salpetersäure löst es sich vollständig und scheidet sich beim Erkalten fast vollständig wieder ab (Strecker, Pecile).

d) Wie das Adenin gibt das Guanin ein Acethyl- und Benzoylderivat und eine Diazoamidoverbindung mit Diazobenzolsulfosäure. Diazobenzolsulfosäure-Guanin:  $(C_5H_5N_4O)N.N=N-C_6H_4HSO_3^1$ . Guanin wird in verdünntem Barytwasser gelöst, mit Diazobenzolsulfosäure versetzt und die Verbindung mit Essigsäure gefällt. Aus Essigsäure umkrystallisiert, lange gelbrote Nadeln, die sich bis  $270^\circ$  ohne Veränderung erhitzen lassen. Löslich in Wasser, wenig löslich in Alkohol, unlöslich in Äther und Benzol. In Alkalien, Ammoniak und Barytwasser mit tieferer Farbe löslich.

4. Zersetzungen. Mit Wasser lässt sich Guanin bis  $250^\circ$ , ohne eine Zersetzung zu erleiden, erhitzen. Mit Kaliumchlorat und Salzsäure oxydiert, zerfällt es in Guanidin und Parabansäure<sup>2)</sup>. Durch salpetrige Säure wird es in Xanthin übergeführt. Dieselbe Desaminierung erleidet es durch gewisse Fermente des Wirbeltierorganismus (s. o. S. 908) und durch Fäulnis<sup>3)</sup>, sowie beim Erhitzen mit 25 %iger Salzsäure auf dem Rückflusskühler<sup>4)</sup>. Durch gewisse Bakterien wird es in Harnstoff, Guanidin und Kohlensäure gespalten<sup>5)</sup>. Beim Erhitzen mit konzentrierter Salzsäure wird es nach Wulf<sup>6)</sup> in Glycocoll, Ammoniak, Kohlensäure und Ameisensäure zerlegt. Bei der elektrolytischen Reduktion liefert es Desoxyguanin<sup>7)</sup>.



<sup>1)</sup> R. Burian, Zeitschr. f. ph. Ch. **51**. 425. 1907. — B. B. **37**. 696. 1904.

<sup>2)</sup> Strecker, Ann. d. Ch. u. Pharm. **118**. 155. 1861.

<sup>3)</sup> Schindler, Zeitschr. f. ph. Ch. **13**. 441. 1889; vgl. auch Schittenhelm und Krüger.

<sup>4)</sup> E. Fischer, B. B. **43**. 805. 1910.

<sup>5)</sup> Ulpiani und Cingolani, Atti della R. ac. dei lincei Roma **14**. II. 596. 1905.

<sup>6)</sup> Zeitschr. f. ph. Ch. **17**. 471.

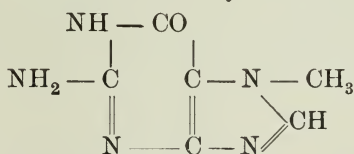
<sup>7)</sup> J. Tafel, B. B. **34**. 1165. 1170. 1901.

Es bildet beim Schmelzen mit Kali keine Blausäure <sup>1)</sup>.

**Darstellung.** Aus Guano <sup>2)</sup>. Nach Wulf <sup>3)</sup> wird Peru-Guano mit verdünnter Schwefelsäure extrahiert, das Extrakt mit Lauge alkalisch gemacht und mit ammoniakalischer Silberlösung gefällt, die gewaschene Fällung wird mit Salzsäure zerlegt, das Filtrat vom Silberchlorid eingeeengt und mit Ammoniak gefällt. Das reine Guanin wird aus 20%iger Salpetersäure unter Zusatz von Harnstoff (um die salpetrige Säure unschädlich zu machen) umkrystallisiert. Nach M. Klimmer <sup>4)</sup> werden 4 kg Guano mit Kalkmilch aus 11—12 kg Kalk 3—4 Stunden gekocht, dann 1 kg Soda zugesetzt und noch einige Stunden gekocht. Dann wird heiss abgeseiht, gepresst und filtriert. Der Rückstand wird so lange mit Soda und eventuell Kalk gekocht, so lange im Filtrat auf Salzsäurezusatz eine Fällung von Harnsäure und Guanin erfolgt. Die vereinigten Filtrate werden mit Salzsäure neutralisiert. Es entsteht eine Fällung. Der aus Guanin und Harnsäure bestehende Niederschlag wird gewaschen und mit 10%iger Salzsäure digeriert, wobei das Guanin in Lösung geht und die Harnsäure zurückbleibt. Die braune Lösung des Guanins wird mit Ammoniak gefällt. Das freie Guanin kann, um zurückgebliebene Spuren von Harnsäure zu zerstören, in das Nitrat umgewandelt und dann wieder mit Ammoniak gefällt werden. Man kann auch die Lösung in Alkali mit Kohlensäure oder Essigsäure fällen. Sättigt man die gesättigte Lösung in verdünnter Lauge unter Erwärmen mit Natriumhydrat, so fällt beim Stehen Guaninnatrium aus, welches mit Alkohol gewaschen werden kann. Auch die Fischschuppen (z. B. die von *Alburnus lucidus* — Burian) eignen sich zur Darstellung.

### 3. Epiguanin.

7-Methylguanin, 2-Amino-6-oxy-7-methylpurin.  $C_6H_7N_5O$ .



**Vorkommen:** Im menschlichen Harn <sup>5)</sup> und in den Nieren <sup>6)</sup>.

<sup>1)</sup> Kossel,

<sup>2)</sup> Strecker, Ann. d. Ch. u. Pharm. 118. 152. 1861. — Neubauer und Kerner, ebenda, 101. 318. 1856.

<sup>3)</sup> Zeitschr. f. ph. Ch. 17. 409. 1893.

<sup>4)</sup> Zeitschr. f. Tiermed. N. F. 2. 100. 1899. J. T. 29.

<sup>5)</sup> Krüger und Wulf, Verhandl. d. phys. Gesellsch. Berlin 1893/94. — Krüger und Salomon, Zeitschr. f. ph. Ch. 24. 385. 1898; 26. 389. 1898/99.

<sup>6)</sup> Okerblom, Zeitschr. f. ph. Ch. 28. 62. 1899.

**Synthese:** Durch Behandeln von 2-Chlor-6-oxy-7-methylpurin mit Ammoniak und nachträgliche Reduktion durch HJ (E. Fischer<sup>1)</sup>).

### Eigenschaften:

1. Beim Übersättigen der salzsauren Lösung mit Ammoniak scheiden sich sofort feine lange Nadeln ab; krystallisiert langsam aus Wasser in feinen Nadeln, schneller aus ammoniakhaltigem Wasser in seidenglänzenden Prismen. Scheidet sich beim Verdunsten seiner wässerigen Lösung auf der Oberfläche der Flüssigkeit in glänzenden prismatischen Krystallen ab; bei weiterem Einengen und beim Erkalten vermehren sie sich nicht wesentlich. Beim Fällen der Lösung in Natronlauge mit einer Säure tritt die Basis in Prismen auf, die lufttrocken eine verfilzte Masse von mattem Seidenglanz bilden. Einmal wurden beim Fällen einer stark salzsauren Lösung mit Ammoniak wetzsteinförmige Krystalle erhalten, die beim Umkrystallisieren aber wieder in Prismen übergangen. Zersetzt sich über 390° ohne zu schmelzen.

2. Sehr schwer löslich in Wasser und in Ammoniak, leichter in Soda, sehr leicht in verdünnter Natronlauge, auch leicht löslich in heisser 33 %iger Natronlauge. Leicht löslich in Salzsäure und in Schwefelsäure, schwerer in Salpetersäure. Schwer löslich in heissem Wasser, fast unlöslich in kaltem.

3. Verbindungen: a) Mit Basen. Aus der Lösung in heisser 33 %iger Natronlauge krystallisieren beim Erkalten stark glänzende, breite zugespitzte Nadeln. — Die wässerige Lösung wird weder durch die Bleiacetate noch durch Bleiessig und Ammoniak gefällt. Mit ammoniakalischer Silberlösung entsteht eine gallertige Silberoxydulverbindung. Kupfersulfat und Bisulfat geben in der Kälte einen gallertigen, in der Wärme einen flockigen Niederschlag. Kupfersulfat und Thiosulfat rufen erst in der Wärme einen flockigen weissen, sich allmählich bräunenden Niederschlag hervor.

b) Mit Säuren. Das charakteristische Chloroplatinat krystallisiert beim Verdunsten seiner wässerigen Lösung in 2—3 mm langen, sechsseitigen, orangefarbenen, prachtvoll glänzenden Prismen. — Die salzsaure Lösung gibt mit Goldehlrid sofort einen Niederschlag von gelben feinen Nadeln. Das Chloraurat bildet beim Verdunsten seiner wässerigen Lösung in der Kälte makroskopische glänzende polyedrische Krystalle. — Das Nitrat tritt in kleinen polyedrischen Krystallen auf. — Das Pyrochromat bildet feine glänzende Prismen. — Es scheidet sich auf Zusatz von Kaliumpyrochromat zur Lösung des salzsauren Salzes nach kurzer Zeit in gelben glänzenden feinen vierseitigen Prismen ab. — Das Pikrat scheidet sich beim Erkalten seiner heissen Lösung in gebogenen haarfeinen Nadeln ab. — Noch in einer Verdünnung der Basis von 1 : 1000 gibt konzentrierte Pikrinsäurelösung nach kurzer Zeit einen glänzenden aus rhombischen und sechsseitigen Plättchen bestehenden Niederschlag; aus stärkeren Lösungen fallen sofort feine gebogene, zu Büscheln und Fächern vereinigte Nadeln aus.

e) Mit Salzen. Quecksilberehlorid gibt mit der wässerigen Lösung der Basis erst auf Zusatz von Natriumcarbonat einen weissen flockigen Niederschlag. Eine Lösung von 1 : 5000 bleibt bei Zusatz von wenig Quecksilberehlorid zunächst vollkommen klar, erst eine grössere Menge Reagens ruft eine allmählich zunehmende Trübung hervor.

4. Zersetzungen: Mit Salzsäure und Kaliumchlorat oxydiert liefert Epiguanin Guanidin.

### Nachweis:

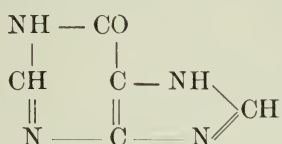
Das Epiguanin hinterlässt beim Eindampfen mit konzentrierter Salpetersäure einen gelben Fleck, der mit Natronlauge orangerot, beim

<sup>1)</sup> B. B. 30. 2411. 1897; 31. 542. 1898.

nachfolgenden Erwärmen violett wird. Die übrigen Farbenreaktionen der Xanthinbasen fallen negativ aus. Der bei der Murexydprobe mit Natronlauge auftretende orangerote Fleck wird beim Erwärmen dunkler und an einzelnen Stellen violett; die Reaktion ist jedoch mit der des Xanthins an Stärke nicht zu vergleichen. Der beim Eindampfen mit konzentrierter Salzsäure und Kaliumchlorat hinterbleibende weisse Rückstand färbt sich in ammoniakhaltiger Luft violettrot<sup>1)</sup>.

#### 4. Hypoxanthin.

Sarkin, 6-Oxypurin.  $C_5H_4N_4O$ . Mol.-Gew. 136. C = 44,11 %; H = 2,94 %; N = 41,17 %; O = 11,78 %.



Es wurde von Scherer im Jahre 1850 im Herzmuskel und der Milz entdeckt<sup>2)</sup>.

Vorkommen: Im Muskel<sup>3)</sup>, im Harn<sup>4)</sup>, bei Leukämie reichlicher als in der Norm bis 0,027 pro Tag (Stadthagen<sup>5)</sup>), im Harn fleischgefütterter Hunde 8,5 mg pro Liter (Baginsky<sup>5)</sup>), in den Fäces<sup>6)</sup>, in der Kuhmilch, im Fleischextrakt, im Blut bei Leukämie, im Zuckerrübensaft<sup>7)</sup>. In den frischen tierischen Organen findet es sich nur in sehr geringer Menge.

Bildung: 1. Trichlorpurin geht durch Alkali in 6-Oxy-2-8-dichlorpurin über, welches bei der Reduktion mit HJ in Hypoxanthin übergeht (E. Fischer<sup>8)</sup>). 2. Thioharnstoff und Natriumcyanessigester geben 4-Amino-6-oxy-2-thiopyrimidin, dieses mit salpetriger Säure ein Isonitrosoderivat, welches bei der Reduktion mit Schwefelammon in 4-5-

<sup>1)</sup> Krüger und Salomon, l. c.

<sup>2)</sup> Ann. d. Ch. u. Pharm. **73**. 328. 1850.

<sup>3)</sup> Strecker, ebenda, **108**. 129. 1858.

<sup>4)</sup> Salkowski, Virchows Arch. **50**. 105. 1870. — Salomon, Zeitschr. f. ph. Ch. **2**. 94. 1878; **11**. 410. 1887. — Pouchet, l. c. — Thudichum, Grundzüge d. anat. u. klin. Ch. 1886. 248.

<sup>5)</sup> Stadthagen, Virchows Arch. **109**. 415. — Baginsky, Zeitschr. f. ph. Ch. **8**. 398.

<sup>6)</sup> Krüger und Schittenhelm, Zeitschr. f. ph. Ch. **35**. 158. 1902. — Weintraud, Zentralbl. f. i. Med. **16**. 453. 1895. — Petren, Skand. Arch. f. Phys. **8**. 315

<sup>7)</sup> Lippmann, B. B. **29**. 2649. 1896.

<sup>8)</sup> B. B. **30**. 2226. 1897.



Diamino-6-oxy-2-thiopyrimidin übergeht. Hieraus entsteht beim Erhitzen mit Ameisensäure 6-Oxy-2-thiopurin, welches mit verdünnter Salpetersäure den Schwefel als Schwefelsäure abspaltet und in Hypoxanthin übergeht (Traube<sup>1)</sup>). 3. Harnsäure mit Chloroform und Alkali erhitzt geht zum Teil in Hypoxanthin über (Sundvik<sup>2)</sup>). 4. Adenin mit salpetriger Säure behandelt spaltet die Aminogruppe unter Hypoxanthinbildung ab<sup>3)</sup>.

#### Eigenschaften:

1. Reines H. krystallisiert nicht in Nadeln, sondern scheidet sich immer am Boden und an der Wand des Gefäßes oder auf der Oberfläche der Flüssigkeit als Haut aus, welche aus vorherrschend rundlichen, aber mit scharfen Ecken versehenen Körnchen besteht. Die wenigen gut ausgebildeten Krystalle, häufig Zwillinge, sind quadratischen Oktaedern ähnlich (Bruhns).

2. Ohne Krystallwasser. Gibt beim Erhitzen ohne zu schmelzen ein schwer flüchtiges Sublimat unter Entwicklung von Blausäure.

3. Scheidet sich nur sehr langsam aus verdünnter Lösung ab. Löst sich nach Strecker in 300 Teilen kaltem und 78 Teilen siedendem Wasser, in 900 Teilen siedendem Alkohol, nach Bruhns dagegen erst in 1880 Teilen kaltem Wasser. Die Lösungen reagieren gegen Lackmus nicht alkalisch (Strecker). Die übrigen Löslichkeitsverhältnisse wie beim Adenin; nur löst sich das H. leichter in Ammoniak als dieses; in Piperazinslösung löst es sich wie das Xanthin nach Salkowski leicht. — Durch Sättigen seiner Lösung mit Chlorammon wird es nach Hopkins<sup>4)</sup> nicht gefällt.

4. Verbindungen: a) Mit Basen. H.-Natrium erhielt Salomon durch Verdunsten der konzentrierten Lösung krystallinisch. Das Salz löst sich sofort in konzentrierter Lauge. Kohlensäure fällt aus der Lösung in Alkalien nach Strecker Hypoxanthin. — Zinksalz und Cadmiumsalz fällen eine Hypoxanthinlösung nicht; auf Zusatz von überschüssigem Ammoniak scheiden sich Flocken von H.-Zinkoxyd und H.-Cadmiumoxyd ab, die sich selbst in der kochenden Flüssigkeit nur wenig lösen. — Bleizucker und Bleiessig fällen H. nicht (Strecker), Bleiessig nur dann nicht, wenn die Lösung Bleizucker enthält (Weidel). Durch Bleiacetat und Ammoniak wird das Hypoxanthin aus seinen Lösungen in Form eines gelatinös-flockigen Niederschlags vollständig gefällt (Krüger und Salomon, Zeitschr. f. ph. Ch. **24**. 1. c.). Eine Lösung von 1 Mol H. in 2 Mol Natriumhydrat gibt nach Krüger mit Bleizucker einen sich anfangs wieder lösenden amorphen Niederschlag; bei Verwendung von 1 Mol Bleizucker zur Fällung beträgt die Ausbeute 91,5 %. — H. wird durch Kupfersulfat und Bisulfit in der Kälte und in der Wärme gefällt, durch Kupfersalz und Thiosulfat aber nur in der Wärme (Krüger). Die Kupferoxydverbindungen löst sich nach Krüger und Wulff<sup>5)</sup> erst in 250 000 Teilen Wasser. In verdünntem Barytwasser gelöst fällt Hypoxanthin bei Zusatz von gesättigtem Barytwasser aus. H.-Silberoxyd  $C_5H_2Ag_2N_4O$ ,  $H_2O$  entsteht beim Fällern von H. mit ammoniakalischer Silberlösung (Strecker). Weisse Gallerte, so gut wie unlöslich im Wasser, schwer löslich auch in starkem Ammoniak. Verliert bei  $120^\circ \frac{1}{2} H_2O$  (Strecker), muss aber dazu mindestens zwei Stunden getrocknet

<sup>1)</sup> Ann. d. Ch. u. Pharm. **332**. 64. 1904.

<sup>2)</sup> Zeitschr. f. ph. Ch. **23**. 476. 1897; **26**. 131. 1898.

<sup>3)</sup> Kossel, ebenda, **10**. 258. — Krüger, ebenda, **18**. 444.

<sup>4)</sup> Salkowski, Pflügers Arch. **56**. 349. 1894. — F. G. Hopkins, Journ. of Pathol. and Bacteriol. 1893. 452.

<sup>5)</sup> G. Salomon, Virchows Arch. **125**. 559. — Weidel, Ann. d. Ch. u. Pharm. **158**. 362. — M. Krüger, Zeitschr. f. physiol. Ch. **18**. 432. 1894; **18**. 355; **20**. 173. — M. Krüger u. Wulff, Zeitschr. f. physiol. Ch. **20**. 184. 1894.

werden. Bei der Behandlung von H.-Silbernitrat mit überschüssigem wässerigen Ammoniak erhält man nach Bruhns<sup>1)</sup> die Verbindung  $C_5H_3Ag_2N_4O + 3H_2O$  in mikroskopischen Nadeln; nicht so leicht entsteht sie auf Zusatz von Silbernitrat zu einer siedenden ammoniakalischen H.-Lösung. Die Verbindung löst sich selbst beim Kochen nur wenig in Ammoniakwasser. Bei 120° gibt sie  $2\frac{1}{2} H_2O$  ab, bei 140—150° verliert sie noch mehr an Gewicht und wird grau, nimmt aber an feuchter Luft wieder nahezu soviel Wasser auf, als sie verloren hatte.

b) Mit Säuren. Die neutralen Verbindungen mit Säuren reagieren gegen Lackmus sauer (Bruhns). — Eine Lösung von H. in heisser konzentrierter Salzsäure scheidet beim Erkalten farblose perlgänzende Tafeln ab, beim Eindampfen einer Lösung in verdünnter Säure Nadeln, auch mehrere Millimeter lange Prismen  $C_5H_3N_4O$ ,  $HCl + H_2O$ . Zersetzen sich mit Wasser sofort. Beim Erkalten der salzsauren Lösung krystallisieren vierseitige, zweiflächig zugespitzte Prismen aus. — Das Chloroplatinat bildet gelbe, in warmem Wasser leicht, in kaltem wenig lösliche Krystalle. — Goldchlorid bildet kein dem Adeninchloraurat ähnliches Salz. — Das Nitrat besteht aus grossen, wasserhellen, rechtwinkligen Krystallen, die sich mit Wasser zersetzen. — Vom Nitrat löst sich 1 g in 940 Teilen einer auf das 10fache Volumen verdünnten Salpetersäure von 1,4 Dichte. Eine solche heiss bereitete Lösung setzt beim Erkalten die Verbindung in spitzen wetzsteinförmigen Rhomben ab, konzentrierte Salpetersäure fällt sie aus wässriger Lösung dagegen in tonnenförmigen Krystallen (den Rhomben ohne Spitzen). — Aus einer Lösung des Hypoxanthins in konzentrierter Schwefelsäure scheiden sich beim Stehen an der Luft oder auf Zusatz von Alkohol farblose Krystallnadeln ab, welche in Wasser zu einem weissen Pulver zerfallen. — Mit Metaphosphorsäure gibt H. keine schwer lösliche Verbindung (Wulff). — Pikrat  $C_5H_4N_4O \cdot C_6H_2(NO_2)_3OH + H_2O$  (Wulff). Versetzt man eine warme Lösung von salzsaurem Hypoxanthin mit Pikrinsäure, so setzen sich beim Erkalten und in der Ruhe 3—4 mm lange kaum gelblich gefärbte prismatische Nadeln ab (Capranica<sup>2)</sup>). Eine neutrale Hypoxanthinlösung gibt mit Pikrinsäure, eine Lösung von H. in Säure mit Natriumpikrat je nach der Konzentration in kürzerer oder längerer Zeit einen Niederschlag von gelben glänzenden Prismen; eine Lösung von 0,141 g H. in 80 cem heissem Wasser beginnt beim Erkalten das Pikrat abzuscheiden. Lufttrocken zitronengelbes glänzendes Pulver, verliert bei 100° Krystallwasser und Glanz. Leicht löslich in heissem Wasser, schwer in kaltem Wasser, leicht löslich in Alkalien, auch in Ammoniak (Wulff). Eine kaltgesättigte Lösung in Säure gibt nicht, wie das Adenin, mit Natriumpikrat einen Niederschlag (Bruhns<sup>3)</sup>). Das Pikrat erhält man in den von Wulff beschriebenen grossen wohl ausgebildeten Krystallen, wenn man die heisse Lösung eines Hypoxanthinsalzes (des Nitrats) mit Pikrinsäure in geringem Überschuss versetzt und in der Ruhe erkalten lässt. In Gegenwart anderer Basen, wie 1-Methylxanthin, und in der Kälte scheidet sich das Pikrat langsam in kleinen kugeligen, aus spitzen Krystallen bestehenden Aggregaten ab. Schüttelt man eine erkaltete Lösung kurze Zeit kräftig, so erhält man ein schweres, weniger glänzendes Pulver in charakteristischen Formen; die kleineren Krystalle bestehen aus wohlausgebildeten, dicken rhombischen Tafeln, die grösseren sind Wetzsteine mit abgebrochenen Spitzen. Das Pikrat löst sich in ungefähr 400 Teilen kaltem Wasser. Bei 200° beginnt es sich dunkler zu färben, ohne einen bestimmten Schmelz- oder Zersetzungspunkt zu zeigen. Von der Pikrinsäure lässt sich die Basis befreien, wenn man die Lösung des Salzes mit Schwefelsäure versetzt und mit Benzol (oder Toluol) ausschüttelt. — H.-Silberpikrat  $C_5H_3AgN_4O \cdot C_6H_2(NO_2)_3OH$ . Eine siedende Lösung von H.-Pikrat (eine Lösung von H.-Nitrat in Gegenwart

<sup>1)</sup> Bruhns, a. a. O. 546.

<sup>2)</sup> G. Bruhns, Zeitschr. f. physiol. Ch. 14. 540. 1890. — Wulff, Zeitschr. f. physiol. Ch. 17. 504. 505 u. 499. — Capranica, Zeitschr. f. physiol. Ch. 4. 233. 1880.

<sup>3)</sup> Bruhns, a. a. O. 540.

von überschüssigem Natriumpikrat) gibt mit neutraler oder schwach saurer Silbernitratlösung allmählich, bei grösserer Konzentration sofort, einen zitronengelben körnigen Niederschlag von feinen kurzen Nadeln. In heissem Wasser wenig, in kaltem gar nicht löslich; die Fällung ist eine nahezu vollständige. Durch wässriges Ammoniak wird dem Salz die Pikrinsäure leicht und vollständig entzogen, es geht die Hälfte des H. in Lösung und zurück bleibt H.-Silberoxyd (Bruhns<sup>1)</sup>).

c) Mit Salzen. Eine Hypoxanthinlösung wird schon durch sehr wenig Quecksilberchlorid flockig gefällt. Mit Quecksilberchlorid hat Bruhns<sup>2)</sup> folgende Verbindungen erhalten. Chlorquecksilberhypoxanthin  $C_5H_3N_4O \cdot Hg \cdot Cl = (C_5H_3N_4O)_2Hg$ ,  $HgCl_2$  entstand auf Zusatz der äquivalenten Menge Quecksilberchlorid zur siedenden Lösung von H. in viel Wasser als geringer krystallinischer Niederschlag, der sich beim Erkalten vermehrte. Das Filtrat enthielt noch viel H. und schied mit Quecksilberchlorid kugelige Nadelaggregate derselben Verbindung von minder reinem Zustand ab. Eine wässrige H.-Lösung gab mit überschüssigem Quecksilberchlorid die krystallinische Verbindung  $C_5H_3N_4O$ ,  $HgCl$ ,  $HgCl_2$ , +  $H_2O$  (oder  $\frac{1}{2} H_2O$ ). Die Lösung dieser in möglichst wenig heisser verdünnter Salzsäure schied beim Erkalten weissliche kugelige Aggregate von blättrigen und nadelförmigen glänzenden Krystallen  $C_5H_3N_4O$ ,  $HgCl_2$  +  $H_2O$  ab. — Das salpetersaure H.-Silber  $C_5H_4N_4O$ ,  $AgNO_3$  krystallisiert in Drusen deutlicher mikroskopischer, manchmal gebogener Prismen (Taf. I. Fig. 6, rechte Hälfte). Es löst sich sehr schwer in kalter Salpetersäure von 1,1 Dichte (in 4960 Teilen, nach Neubauer<sup>3)</sup> in 4470 Teilen), namentlich schwer bei Gegenwart von überschüssigem Silbernitrat (nach Neubauer in 42 250, nach Bruhns<sup>4)</sup> in 17 100 Teilen), und scheidet sich aus der heissen Lösung beim Erkalten wieder ab. Es ist lichtbeständig und unlöslich in Wasser. Lässt sich aus Salpetersäure umkrystallisieren. Besitzt aber nach Bruhns<sup>5)</sup> die angegebene Zusammensetzung nur dann, wenn es nicht vollständig ausfällt, und auch da nicht immer, sondern ist silberreicher (35,6 % statt 35,29). Durch Umkrystallisieren in Gegenwart von Silbernitrat steigt der Silbergehalt im Mittel bis zu 36,5 % und zwar um so höher, je mehr sich Silbernitrat in Lösung befindet; durch Umkrystallisieren dieser silberreichen Verbindung aus Salpetersäure sinkt der Silbergehalt wieder auf 35,6—35,8 %. Beim Auswaschen verliert es öfter etwas salpetersaures Silber. Durch Digerieren mit Ammoniak geht es unter Verlust der Hälfte H. in H.-Silberoxyd über.

d) 7-Diazobenzolsulfosäure-Hypoxanthin,



hellgelbe Nadeln, Schmelzpunkt 270, löslich in Wasser, wenig löslich in Alkohol und Äther. Es gibt mit konzentriertem Baritwasser einen roten krystallinischen Niederschlag, ein schwarzrotes, gallertiges Silber- und ein bläulich-rotes Bleisalz (R. Burian<sup>6)</sup>).

e) Bromhypoxanthin wurde von Krüger beschrieben<sup>7)</sup>.

5. Zersetzungen. Beim Schmelzen mit Kaliumhydroxyd liefert es nicht die Hälfte seines Stickstoffes an Ammoniak und Blausäure (Kossel<sup>8)</sup>). Mit HCl auf 180—200 erhitzt, geht es in Kohlensäure, Ammoniak und Glycocoll über (Krüger<sup>9)</sup>).

Darstellung: Aus Fleischextrakt. Die Lösung des Extraktes wird mit Bleiessig gefällt, das Filtrat durch Schwefelwasserstoff vom

<sup>1)</sup> Bruhns, a. a. O. 555.

<sup>2)</sup> Bruhns, a. a. O. 570.

<sup>3)</sup> Neubauer, Zeitschr. f. analyt. Ch. 6. 35. 1867.

<sup>4)</sup> Bruhns, a. a. O. 549.

<sup>5)</sup> Bruhns, a. a. O. 547.

<sup>6)</sup> B. B. 37. 696. 1904.

<sup>7)</sup> Zeitschr. f. ph. Ch. 18. 445. 448. 1894.

<sup>8)</sup> Ebenda. 10. 258.

<sup>9)</sup> Zeitschr. f. ph. Ch. 16. 171. 1892.



überschüssigen Blei befreit und das Filtrat vom Bleisulfid eingeeengt, mit Ammoniak versetzt und mit ammoniakalischer Silberlösung gefällt. Der Niederschlag wird nach dem Waschen in heisser Salpetersäure gelöst, beim Erkalten fällt das Hypoxanthinsilbernitrat krystallisiert aus. Durch Zerlegen der Verbindung durch Schwefelwasserstoff wird die freie Base erhalten.

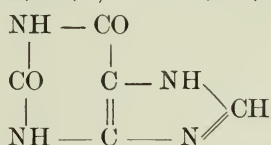
Nachweis: Das H. gibt mit Natronlauge und Chlorkalk keine grüne Färbung wie das Xanthin (Salkowski). Auch die übrigen Xanthinproben sind negativ. Dagegen gibt das H. die Kosselsche Adeninreaktion mit Zink und Salzsäure.

### 5. Episarkin.

Balke<sup>1)</sup> stellte aus Menschenharn in einer Ausbeute von 0,4 g aus 1600 Liter eine Purinbase dar, welche er Episarkin nannte. Eine ähnliche Substanz stellte Salomon<sup>2)</sup> aus leukämischem sowie aus Schweine- und Rinderharn dar. Nach den Untersuchungen von Krüger und Salomon handelt es sich um Epiguanin<sup>3)</sup>.

### 6. Xanthin.

2-6-dioxypurin.  $C_5H_4N_4O_2 (+ H_2O)$ . Mol.-Gew. 152,04. C = 39,46; H = 2,65%; N = 36,85%.



Vorkommen: Seit Marcet (1819)<sup>4)</sup> ist das Xanthin einige Male als einziger oder wesentlicher Bestandteil von Harnsteinen angetroffen worden; Strecker und Scherer haben es zuerst gleichzeitig sicher als Bestandteil des normalen Menschenharns erkannt. Bei Versuchen im Kleinen hat es Salomon<sup>5)</sup> manchmal vermisst.

Es ist auch von Pecile und von Salomon im Harn der Schweine, sowie von Salomon im Hundeharn nachgewiesen worden. Im Harn Leukämischer ist es in grösserer Menge vorhanden als in dem Gesunder; in relativ sehr reichlicher Menge (bis 28,5 mg in 100 cc) hat es

<sup>1)</sup> Journ. f. prakt. Ch. **47**. 544, 563. 1893.

<sup>2)</sup> Virchows Arch. **95**. 527. 1884. Zeitschr. f. ph. Ch. **18**. 207. 1893.

<sup>3)</sup> Zeitschr. f. ph. Ch. **24**. 380. 391. 1898.

<sup>4)</sup> An essay on the chemical history and medical treatment of calcul disorders, London 1817.

<sup>5)</sup> Strecker, Ann. d. Ch. u. Pharm. **102**. 208. 1857; **108**. 140 u. 151. 1858. — Scherer, daselbst **107**. 314. 1858. — G. Salomon, Virchow's Archiv **125**. 565.



Baginsky im Harn nephritischer Kinder aufgefunden, während bei gesunden Kindern in 100 cc Harn nur 3,8 mg nachgewiesen wurden. Gleichfalls in grösserer Menge fand es Pouchet<sup>1)</sup> bei Fieber und besonders bei Affektionen des Nervensystems.

Aus 10 000 Liter Menschenharn stellten Krüger und Salomon<sup>2)</sup> 13 g Xanthin dar. — Stadthagen bestimmte in der Tagesmenge Harn Gesunder bei gemischter Kost 0,032 und 0,025 g Xanthin, im Harn eines Leukämischen fand er für den Tag im Mittel aus 7 Bestimmungen 0,07 g (0,005—0,159). — Weißke fand Xanthin als Sediment im Harn eines leukämischen Schafbocks. — Bei einer Pachymeningitis cervicalis hypertrophica wies Pouchet 0,15 g Xanthin in der Tagesmenge Harn, bei Tabes dorsalis 0,08 g nach. — Im Harn eines Hundes bestimmte Stadthagen neben 57 g Harnstoff 0,014 g Xanthin; Baginsky<sup>3)</sup> fand im Harn eines mit 1 Kilo Pferdefleisch gefütterten Hundes nur Spuren Xanthin auf, mehr dagegen nach gleichzeitiger Verfütterung von Hypoxanthin. Aus dem Liter Harn eines mit Kleie gefütterten, anscheinend gichtkranken Schweines stellte Pecile 0,0034 g Xanthin dar. Xanthin kommt ferner im Guano<sup>4)</sup> und in den menschlichen Fäzes vor<sup>5)</sup>.

**Bildung:** 1. Trichlorpurin und Natriumäthylat auf 100° erhitzt, liefert 2-6-Dioxy-8-chlorpurin, welches mit HJ in Xanthin übergeht (E. Fischer<sup>6)</sup>). 2. Cyanessigsäureäthylester und Harnstoff geht beim Stehen mit Alkali in 4-Amino-2-6-dioxypyrimidin über, welches mit salpetriger Säure ein Isonitrosoderivat gibt. Dieses liefert durch Schwefelammon reduziert Iminouramil (4-5-Diamino-2-6-dioxypyrimidin), aus welchem Ameisensäure eine Formilverbindung bildet. Erhitzt man das Natriumsalz dieses Stoffes auf 220°, so entsteht Xanthin bzw. Xanthinnatrium (Traube<sup>7)</sup>). 3. Aus Harnsäure durch naszierende Ameisensäure (Chloroform und Alkali) auf dem Wasserbade (Sundvik<sup>8)</sup>). 4. Aus Guanin durch salpetrige Säure, Fäulnis, Fermente und durch Kochen mit 25%iger Salzsäure auf dem Rückflusskühler (E. Fischer<sup>9)</sup>).

#### Eigenschaften:

1. Das reine Xanthin krystallisiert nach Horbaczewski aus seiner heissen stark verdünnten Lösung (1 : 2000) in wenig Alkali nach dem Übersättigen mit

<sup>1)</sup> D. Pecile, Ann. d. Ch. 183. 141. 1876. — G. Salomon, Du Bois' Archiv 1884. 175; Virchow's Archiv 95. 527. — Salomon, Ztschr. f. physiol. Ch. 11. 413. 1887. — Baginsky, Du Bois' Archiv. 1884. 176; Ztschr. f. physiol. Ch. 8. 399. — A. Gabriel Pouchet, Contributions à la connaissance des matières extractives de l'urine. Thèse. Paris 1880, Parent. 28 und 36.

<sup>2)</sup> M. Krüger und G. Salomon, Zeitschr. f. physiol. Ch. 21. 169. 1895.

<sup>3)</sup> M. Stadthagen, Virchow's Arch. 109. 414, 406, 418. — H. Weiske, Zeitschr. f. Biol. 11. 254. 1875. — Baginsky, Zeitschr. f. physiol. Ch. 8. 397.

<sup>4)</sup> Strecker, Ann. d. Ch. u. Pharm. 118. 157. 1861.

<sup>5)</sup> Krüger und Schittenhelm, Zeitschr. f. ph. Ch. 35. 161. 1902.

<sup>6)</sup> B. B. 30. 2232. 1897.

<sup>7)</sup> B. B. 33. 1317, 3043. 1900.

<sup>8)</sup> Zeitschr. f. ph. Ch. 23. 476. 1897; 26. 131. 1898/99.

<sup>9)</sup> B. B. 43. 805. 1910.

Essigsäure in makroskopischen farblosen glänzenden, aus dünnen grossen rhombischen Platten zusammengesetzten Drusen. Bei schneller Krystallisation scheiden sich, namentlich aus der Lösung nicht ganz reinen Xanthins dem unreinen Leucin ähnliche, radiär und konzentrisch gestreifte Kugeln ab, auch wetzsteinförmige, der Harnsäure zum Verwechseln ähnliche Krystalle.

Aus konzentrierten wässerigen Lösungen erhält man das Xanthin amorph als Pulver, in Flocken, Häuten und Krusten; manchmal trübt sich die kochend bereitete Lösung milchig und klärt sich selbst bei wochenlangem Stehen nicht vollständig. Das schwefelsaure Xanthin hinterlässt beim Behandeln mit Wasser Xanthin in der Form der ursprünglichen Krystalle (rhombische Tafeln). Beim Stehen reinsten Xanthins in Kalilauge setzen sich neben doppelt kohlensaurem Kali deutlich krystallinische Plättchen ab, die sich durch Wasser vom Kalisalz trennen lassen (Strecker<sup>1)</sup>).

2. Das krystallisierte Xanthin enthält 1 Mol. Krystallwasser, welches es erst bei 125—130° abgibt. Das amorphe ist wasserfrei. Beim Erhitzen sublimiert das Xanthin ohne zu schmelzen unter Entwicklung von Blausäure zum Teil unzersetzt.

3. Es löst sich in ungefähr 13 000—14 000 Teilen kaltem und 1300—1400 Teilen heissem Wasser; in verdünntem Alkohol löst es sich schwerer, in einem Überschuss von Ammoniak oder Alkalihydrat viel leichter als in Wasser; auch Piperazinslösung löst es wie das Hypoxanthin nach Salkowski<sup>2)</sup> leicht. Verdünnte Säuren lösen es schwer und halten es schwer in Lösung. Nach Stadthagen lässt eine mit Salzsäure übersättigte Lösung bei mehrtägigem Stehen einen kroidigen Niederschlag von Xanthin ausfallen. Zu seiner Lösung bedarf es eines relativ grossen Überschusses von Säure; nach Wulff lösen 50 ccm Salzsäure von ungefähr 4 % 0,3 g Xanthin in der Kälte und 0,4 g in der Wärme durchaus nicht vollständig; selbst Lösungen mit nur 0,1—0,2 % Xanthin in 10 %ige Salzsäure geben binnen 1—3 Tagen einen Niederschlag. In konzentrierter Schwefelsäure löst es sich nach Liebig und Wöhler ohne beim Verdünnen mit Wasser sogleich einen Niederschlag zu geben; bei längerem Stehen der mit 4 Vol. Wasser verdünnten Lösung scheidet sich nach Horbaczewski jedoch auch hier eine geringe Menge Xanthin ab. — Beim Sättigen einer Xanthinlösung mit Salmiak fällt nach Hopkins<sup>2)</sup> Xanthin aus.

4. Verbindungen. a) Mit Basen. Eine warm gesättigte Lösung von Xanthin in 10 %igem Ammoniak liefert beim Erkalten äusserst feine, häufig zu Sternen verwachsene Nadeln von Xanthin-Ammoniak (Staedeler, Strecker). Löst man Xanthin in sehr wenig Natronlauge, so setzen sich nach Balke beim Stehen oft zu Drusen vereinigte Nadelchen von Xanthin-Natron  $C_5H_3NaN_4O_2 + H_2O$  ab, welche das Wasser erst bei 190 bis 200° abgeben. Die Krystalle lösen sich mit alkalischer Reaktion ziemlich leicht in Wasser und lassen sich umkrystallisieren, wobei sie eine teilweise Zersetzung erleiden und sich das Xanthin in gelatinösen Flocken abscheidet. Die Verbindung löst sich im Gegensatz zum Heteroxanthin und Paraxanthin sofort in konzentrierter Lauge (Salomon), wie in verdünnter; aus der alkalischen Lösung kann die Verbindung durch Einleiten von Kohlensäure wieder gefällt werden (Balke<sup>3)</sup>), wird

<sup>1)</sup> J. Horbaczewski, Zeitschr. f. physiol. Ch. 23. 226. 1897. — Strecker, Ann. d. Ch. u. Pharm. 108. 143. 1858.

<sup>2)</sup> Salkowski, Pflügers Arch. 56. 349. 1894. — Stadthagen, Virchows Arch. 109. 401. — C. Wulff, Zeitschr. f. physiol. Ch. 17. 636. 1893. — Liebig und Wöhler, Ann. d. Ch. u. Pharm. 26. 340. 1838. — J. Horbaczewski, Zeitschr. f. physiol. Ch. 18. 344. — F. Gowland Hopkins, Journ. of Pathol. and Bacteriol. 1893. 452.

<sup>3)</sup> Staedeler, Ann. d. Ch. u. Pharm. 111. 32 u. 37. — Strecker, Ann. d. Ch. u. Pharm. 118. 167. — P. Balke, Journ. f. prakt. Ch. [2]. 47. 559. 1893. — G. Salomon, Virchows Arch. 125. 559.

aber die Behandlung mit Kohlensäure bis zur Bildung von Bicarbonat fortgesetzt, so scheidet sich freies Xanthin ab (Liebig und Wöhler<sup>1)</sup>). Durch Salmiak wird aus der Lösung von Xanthin in Kaliumhydrat kein Xanthin gefällt, erst beim Verdunsten scheidet sich das Xanthin ab (Liebig und Wöhler). Gegen saure Salze, einschliesslich des Bicarbonats, verhält sich die alkalische Xanthinlösung wie die des Heteroxanthins und des Paraxanthins. — Saurer sowie schwach alkalischer Harn löst nach Bence Jones Xanthin, ohne dass es sich bei mässigem Verdunsten wieder abscheidet.

Eine Lösung von Xanthin in Ammoniak gibt mit einer ammoniakalischen Chlorcadmium- oder Chlorzinklösung einen weissen, in viel Ammoniak löslichen Niederschlag. Essigsäures Blei liefert mit der ammoniakalischen Lösung weisse Flocken, die sich beim Stehen öfters in glänzende Krystallschuppen verwandeln (Strecker). Löst man nach E. Fischer Xanthin in der zur Bildung des neutralen Salzes  $C_5H_4N_4O_2Na_2$  nötigen Menge Natronlauge und versetzt heiss mit essigsaurem Blei, so entsteht ein weisser krystallinischer Niederschlag (von  $C_5H_4N_4O_2Pb$ ).

b) Mit Säuren. Salzsaures Xanthin,  $C_5H_4N_4O_2$ , HCl, kugelige und warzenförmige Anhäufungen mikroskopischer Krystalle, die aus rauen Oktaedern mit abgestumpften Seitenkanten und spitzen rhombischen Plättchen bestehen; löslich in 153 Teilen (salzsäurehaltigem) Wasser (Strecker). Das Salz zersetzt sich selbst in salzsaurer Lösung leicht unter Abscheidung von Xanthin (3). — Das Platinsalz bildet gelbe, leicht lösliche Nadeln. — Das Nitrat besteht aus feinen zu gewimperten Kugeln zusammengesetzten Krystallen (Strecker); es ist in mässig verdünnter Salpetersäure so gut wie unlöslich. — Aus der heissen Lösung in nicht völlig konzentrierter Schwefelsäure krystallisiert das Sulfat  $C_5H_4N_4O_2 \cdot H_2SO_4 + H_2O$  in perlmutterglänzenden, rhombischen Tafeln (Strecker); die Lösung in verdünnter Schwefelsäure hinterlässt beim Verdunsten mikroskopische Nadelbüschel. Das Salz zersetzt sich mit Wasser vollständig unter Hinterlassung des Xanthins in der Form der ursprünglichen Krystalle. — Das Pikrat ist löslich. — Eine mit Salpetersäure angesäuerte Xanthinlösung gibt nach Kerner<sup>2)</sup> mit Phosphormolybdänsäure in einer Verdünnung von 1 : 2000 sogleich einen hellorangefarbenen Niederschlag, in einer Verdünnung von 1 : 10 000 sogleich noch eine leichte Trübung, die sich beim Stehen als schwacher Niederschlag absetzt. Die Niederschläge lösen sich in warmer verdünnter Salpetersäure und krystallisieren als regelmässige mikroskopische, zimtfarbene Würfel wieder aus.

c) Mit Salzen. Salpetersaures Xanthin-Silber,  $C_5H_4N_4O_2$ ,  $AgNO_3$ , fällt als flockiger Niederschlag beim Versetzen einer Lösung von salpetersaurem Xanthin mit salpetersaurem Silber, scheidet sich auch aus einer Lösung von Xanthin-Silber in heisser verdünnter Salpetersäure aus, aber um so langsamer und unvollständiger, je stärker die Säure und je weniger Xanthin in Lösung war. Es besteht aus mikroskopischen Drusen zarter gekrümmter Nadeln. Beim Auswaschen verliert es alle Salpetersäure und einen Teil des Silbers (Strecker). — Der gallertige Niederschlag, welchen Xanthin mit ammoniakalischer Silberlösung gibt, ist in Ammoniak in geringem Grade löslich. Die Verbindung mit Silbernitrat ist schwerer löslich als die des Heteroxanthins; sie krystallisiert in stark lichtbrechenden kugeligen Aggregaten mikroskopischer Nadeln und bildet im Gegensatz zum 1-Methylxanthin ein schweres Krystallpulver (Krüger und Salomon). — Xanthin gibt auch mit salpetersaurem Quecksilber-Oxyd oder -Oxydul Niederschläge. Alle Quecksilber enthaltenden Xanthinniederschläge scheiden beim Stehen metallisches Quecksilber ab.

d) 7-Diazobenzolsulfosäure-Xanthin,  $(C_6H_3N_3O_2)N \cdot N = N \cdot C_5H_4SO_3H$ , dunkeldottergelbe Nadeln, beim Erhitzen auf 265° unverändert, löslich in Wasser, wenig löslich in Alkohol, unlöslich in Äther, löslich in Alkalien. Durch

<sup>1)</sup> Anm. d. ch. Ph. 26. 340. 1838.

<sup>2)</sup> Strecker, Ann. d. Ch. u. Pharm. 108. 146. 1858. — Kerner, Pflügers Arch. 2. 222.

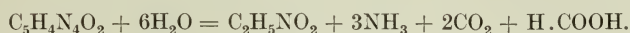


Lösen von Xanthin und Diazobenzolsulfosäure in Alkali und Fällen mit Säure (R. Burian<sup>1)</sup>).

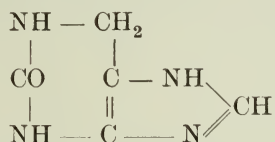
e) Xanthinblei gibt mit Jodmethyl Theobromin (E. Fischer).

5. Zersetzungen: Gegen heisse verdünnte Salpetersäure ist das Xanthin beständig (Wulff<sup>2)</sup>).

Wird es mit rauchender Salzsäure über 200° erhitzt, so zerfällt es nach Schmidt<sup>3)</sup> in Glykokoll, Ammoniak, Kohlensäure und Ameisensäure nach



Durch elektrolytische Reduktion entsteht Desoxyxanthin (2-Oxy-6-dihydropurin). Tafel<sup>4)</sup>.



Darstellung: Durch Desaminierung des Guanins, indem man zur Lösung des Guanins in Schwefelsäure Natriumnitrit zufügt<sup>5)</sup>.

Nachweis: Mit Chlorwasser oder Chlorat und Salzsäure eingedampft entsteht ein gelber Fleck, welcher bei höherer Temperatur rot wird und dann mit Ammoniak befeuchtet purpurrote Farbe annimmt (Murexid<sup>6)</sup>). Dieselbe Reaktion gibt die Harnsäure, ihre Methylderivate und die Methylderivate des Xanthins (Kaffein, Theobromin etc.), es ist die sogenannte Weidelsche Reaktion.

Fügt man einer Lösung von Xanthin in fixem Alkali Chlornatron oder Chlorkalk hinzu, so entwickelt sich etwas Stickstoff und die Lösung wird nacheinander blau, braun und zuletzt gelb (Liebig und Wöhler<sup>7)</sup>). Bringt man in eine Mischung von Chlorkalk und Natron (in einem Uhrglas) eine Probe von Xanthin, so bildet sich um die Körnchen zuerst ein dunkelgrüner, bald ins Braune übergehender Hof, der schliesslich wieder verschwindet (Hoppe-Seyler). Die Grünfärbung tritt jedoch nur dann deutlich hervor, wenn das Xanthin schon ziemlich rein ist (Salkowski).

<sup>1)</sup> B. B. 37. 703. 1904.

<sup>2)</sup> C. Wulff, a. a. O. 639.

<sup>3)</sup> E. Schmidt, Ann. d. Ch. 217. 309. 1883.

<sup>4)</sup> B. B. 34. 1165. 1170. 1901.

<sup>5)</sup> Fischer, Ann. d. Ch. u. Pharm. 215. 309. 1882.

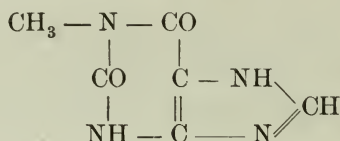
<sup>6)</sup> Kossel, Zeitschr. f. ph. Ch. 6. 431. 1882. — Fischer, B. B. 15. 453. 1882. Ann. d. Ch. u. Pharm. 213. 310. 1882.

<sup>7)</sup> Liebig und Wöhler, a. a. O.



## 7. 1-Methylxanthin.

1-Methyl-2-6-dioxypurin.  $C_6H_6N_4O_2$ . Mol.-Gew. 166,04. C = 43,37; H = 3,61; N = 38,73 %.



Vorkommen: Im normalen Menschenharn<sup>1)</sup>, im Harn des Kaninchens nach Fütterung von Kaffein und Paraxanthin<sup>2)</sup>, bei der Autolyse der Nebennieren<sup>3)</sup>.

## Eigenschaften:

1. Scheidet sich aus Wasser in der Form mikroskopischer gleichförmiger Rosetten als farbloses nicht glänzendes Krystallpulver ab. Beim Eindampfen seiner salzsauren oder ammoniakalischen Lösung auf dem Wasserbade, manchmal auch beim Übersättigen seiner Lösung in fixem Alkali wird es als lockere irisierende Masse gewonnen; dieselbe besteht aus Geschieben rhomboidaler, äusserst dünner und schwach lichtbrechender Tafeln, an denen zumeist eine Ecke abgestumpft ist und die benachbarte sich einem rechten Winkel nähert; daneben finden sich vielfach kleinere weniger entwickelte, zu Büscheln angeordnete Tafeln und in grosser Menge spitze Krystalltrümmer.

2. Löst sich schwer in kaltem Wasser, jedoch beträchtlich leichter als das Xanthin, leicht in Ammoniak und in Natronlauge, sowie in verdünnter Salzsäure Salpetersäure und Schwefelsäure.

3. Verbindungen: a) Mit Basen. Beim Einengen seiner Lösung in 15 %iger Natronlauge krystallisiert die Natriumverbindung in makroskopischen glasglänzenden Prismen mit endständiger Abdachung, auch in sechsseitigen Tafeln. Leichtlöslich in Wasser. In schwacher Ammonnitratlösung verwandeln sich die Krystalle fast unmittelbar in Büschel und Einzelexemplare gut ausgebildeter Nadeln. Es bildet kein schwerlösliches Barytsalz wie das 3-Methylxanthin. Mit ammoniakalischer Silberlösung entsteht eine schwerlösliche gallertige Silberoxydulverbindung. Kupfersulfat und Bisulfat erzeugen in der Kälte einen voluminösen, in der Wärme einen weissen flockigen Niederschlag; Kupfersulfat und Thio-sulfat fallen nur in der Wärme.

b) Mit Säuren. Das Chlorid und das Nitrat krystallisieren erst nach starker, in der Kälte erfolgter Einengung. Das Chlorid bildet schöne glasglänzende rhombische Plättchen und Säulen, das Nitrat lange vierseitige Prismen mit zweiflächiger Abstumpfung, in verkürzter Form sechsseitige Plättchen. Diese Salze werden durch Wasser leicht zersetzt. Aus konzentrierten Lösungen scheidet sich das Chloroplatinat in sternförmig gruppierten Nadeln oder in Prismen, das Chloraurat in glänzenden rhombischen Säulen aus.

c) Mit Salzen. Quecksilberchlorid gibt nur eine in der Wärme verschwindende Trübung, auf nachfolgenden Zusatz von Natriumcarbonat einen weissen

<sup>1)</sup> Krüger und Salomon, Zeitschr. f. ph. Ch. **24**. 364. 1898; **26**. 358. 1898/99.

<sup>2)</sup> Krüger und Schmid, B. B. **32**. 2680. 1899; — Krüger, B. B. **32**. 3336. 1899.

<sup>3)</sup> Okerblom, Zeitschr. f. ph. Ch. **28**. 60. 1899.

flockigen Niederschlag. — Ammoniakalische Silberlösung fällt gallertig. Aus der Lösung in Salpetersäure von 1,1 Dichte fällt die Verbindung der Base mit salpetersaurem Silber als voluminöser Niederschlag in Rosetten kleiner Nadeln, wodurch sie sich von der des Xanthins unterscheidet. Sie besitzt dieselbe Löslichkeit wie das Xanthin-Silbernitrat.

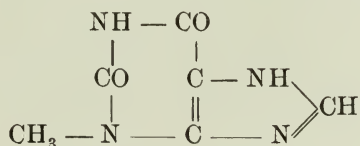
4. Beim Methylieren entsteht Theophyllin und Kaffein.

Nachweis: Die Weidelsche Probe ist positiv.

Beim Verdampfen der Substanz mit Salpetersäure von 1,4 Dichte zur Trockne hinterbleibt ein gelber Fleck, der mit Natronlauge orange-farben wird; in der Wärme ist diese Färbung lebhafter. Der nach dem Verdunsten der Substanz mit Kaliumchlorat und Salzsäure auf dem Wasserbade bleibende Rückstand färbt sich in einer Ammoniakatmosphäre stark purpurrot. Natronlauge färbt den Rückstand ebenso; setzt man nach dem Erkalten ein paar Tropfen Wasser zu, so tritt plötzlich eine prächtige blauviolette Färbung auf, die beim Erwärmen verschwindet. Besonders schön tritt die Färbung, von purpurrot bis intensiv violett, ein, wenn die Xanthinprobe in der von E. Fischer angegebenen Weise angestellt wird.

### 8. 3-Methylxanthin.

3-Methyl-2-6-dioxypurin.  $C_6H_6N_4O_2$ . Mol.-Gew. 166,04. C = 43,37%; H = 3,61%; N = 38,83%.



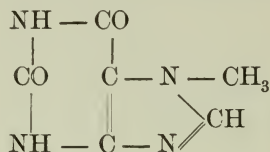
Vorkommen: Im Harn nach Fütterung von Theobromin, Theophyllin und Kaffein.

Eigenschaften: Farblose Prismen. Löslich in 350 Teilen kochenden Wassers. Schwer löslich in Alkohol, noch schwerer in Chloroform und Essigester. Bei 360° zersetzt es sich ohne zu schmelzen. Konzentrierte Natronlauge fällt das Natriumsalz in Nadeln. Löslich in Ammoniak, scheidet sich nach dem Wegkochen des Ammoniaks wieder aus <sup>1)</sup>. Das Bariumsatz ist in heißem Wasser schwer löslich. Die Verbindungen mit Säuren sind wenig beständig. Das Nitrat krystallisiert beim Erkalten aus. Mit ammoniakalischer Silberlösung sowie mit Kupfersulfat und Bisulfit entstehen die entsprechenden unlöslichen Fällungen. Die Methylierung führt zu Theobromin und Kaffein. Die Murexidreaktion ist positiv.

<sup>1)</sup> Fischer und Ach, B. B. 31. 1980. 1898.

## 9. Heteroxanthin.

7-Methyl-2-6-oxy purin.  $C_6H_6N_4O_2$ . Mol.-Gew. 166,04. C = 43,37%;  
H = 3,61%; N = 38,73%.



Vorkommen: Das Heteroxanthin ist von Salomon im Harn des Menschen entdeckt worden; derselbe Forscher fand es auch im Harn des Hundes bei Fütterung mit Fleisch und Gemüse, sowie nach Vergiftung mit Phosphor, sowie in reichlicher Menge im leukämischen Harn auf. Dem Körper zugeführtes Theobromin und Kaffein erscheinen nach Bondzynski und Gottlieb sowie Albanese<sup>1)</sup> im Harn als Heteroxanthin.

Salomon gewann aus 1000 Liter Menschenharn nur etwa 1 g davon, und aus 10 000 Litern Menschenharn stellten Krüger und Salomon 7,5 g dar; doch ist es nach Salomon noch in einigen Litern (0,85—6 Liter) nachweisbar (bis zu 10 mg in 5 Liter) wenn auch nicht immer. Aus 6,3 Liter leukämischem Harn gewann Salomon 15 mg. Für die Darstellung aus Hundeharn genügten 27,5 Liter (130 mg) (Salomon), in 60 Liter Rinderharn dagegen konnte Salomon Heteroxanthin nicht nachweisen. Aus 2 Liter Hundeharn stellte Albanese<sup>2)</sup> 11 mg, aus 15 Liter Hundeharn 80 mg eines Gemenges von Heteroxanthin und Xanthin dar. Bei den gastrischen Krisen der Tabiker soll es im Harn reichlich vorhanden sein<sup>3)</sup>.

Von dem Monomethylxanthin, welches nach Bondzynski und Gottlieb sowie nach Albanese beim Hund nach Verfütterung von Theobromin oder Caffein im Harn auftritt, haben Bondzynski und Gottlieb<sup>4)</sup> nachgewiesen, dass es nicht bloss denselben Schmelzpunkt besitzt wie das von Salomon im Harn aufgefundene, sondern dass es sich, wie dieses, beim Erhitzen mit Salzsäure unter Bildung von Sarkosin zersetzt. Damit ist der Beweis von der Identität beider Monomethylxanthine erbracht.

Synthese: E. Fischer<sup>5)</sup> erhielt durch Chlorieren des Theobromins mit Phosphoroxychlorid 7-Methyl-2-6-dichlorpurin, aus welchem durch Behandeln mit HCl bei 120—125° Heteroxanthin entstand.

<sup>1)</sup> Salomon, Du Bois' Archiv 1885. 370; Berichte d. chem. Gesellsch. 18. 3407. 1885; Ztschr. f. physiol. Ch. 11. 412 u. 415. — St. Bondzynski u. R. Gottlieb, Berichte d. chem. Gesellsch. 28. 1113. 1895; Archiv f. exper. Pathol. 36. 45. — M. Albanese, Archiv f. exper. Pathol. 35. 449. 1895.

<sup>2)</sup> M. Krüger und G. Salomon, Zeitschr. f. physiol. Ch. 21. 169. 1895. — Salomon, Virchows Arch. 125. 564. — M. Albanese, a. a. O. 35. 457.

<sup>3)</sup> Bashford, New York med. News 1894. Mai und November; Med. Rec. 1895. Juni.

<sup>4)</sup> St. Bondzynski und R. Gottlieb, Berichte d. chem. Gesellsch. 28. 1113. 1895; Archiv. f. exper. Pathol. 36. 45. — M. Albanese, Arch. f. exper. Pathol. 37. 385. 1895. — Bondzynski und Gottlieb, Arch. f. exper. Pathol. 37. 388. 1895.

<sup>5)</sup> B. B. 30. 2403. 1897.



## Eigenschaften:

1. Das reine Heteroxanthin krystallisiert aus heissem Wasser in glänzenden Nadeln (Albanese), in halbzentimeterlangen Nadeln oder in längeren oder kürzeren mikroskopischen, zu stacheligen Kugeln und dichten Fächern angeordneten Säulen (Bondzyński und Gottlieb). Es kann auch bei schnellem Eindampfen noch etwas gefärbter Substanz (B. u. G.) amorph in Krusten und Knollen ausfallen, kann aber bei langsamer Ausscheidung dann mohngrosse Aggregate bilden und sich bei längerem (24stündigem) Verweilen unter Wasser bisweilen in die beschriebenen Krystalle verwandeln (Salomon). Die Flocken, in welchen das H. aus der Natronlösung auf Zusatz von Essigsäure ausfällt, verwandeln sich bald in Krystalle (B. u. G.). Aus ammoniakalischer Lösung erhält man (das Ammonsalz?) blättrige Krusten (B.) oder gleichseitige sphärische Dreiecke (Balke<sup>1</sup>).

2. Schmilzt ungefähr bei 341—342° unter Sublimation und Zersetzung (B. u. G.); verflüchtigt sich auf dem Platinblech unter Entwicklung von Blausäure.

3. Löslich in 1592 cem Wasser von 18° und in 109 cem siedendem, in 7575 cem absolutem Alkohol bei 17° und in 2250 cem siedendem (B. u. G.), unlöslich in Äther; Chloroform löst die reine Basis nicht nachweisbar, die unreine in geringer Menge und bedeutend schwieriger als Theobromin (B.); geht aus der wässrigen Lösung leicht in Chloroform über (A.). Phenol nimmt bei 45° nur 2 % der Substanz auf (B.). — Leicht löslich in Ammoniak und in Alkalien, aus der Lösung schon durch Kohlensäure fällbar (S., A.).

4. Verbindungen: a) Mit Basen. Das Natriumsalz enthält 5H<sub>2</sub>O und verliert das Krystallwasser vollständig erst bei 110—120°. Es löst sich, auf die freie Basis berechnet, in 2077 Teilen 3,3 %iger Natronlauge. Aus der heissen Lösung desselben scheidet Kohlensäure die Basis krystallinisch ab. Man erhält es nach Salomon<sup>2</sup>) durch Zusatz von Natronlauge zu der konzentrierten Lösung der Basis (eines Salzes derselben) in makroskopischen, wasserklaren, vollkommen luftbeständigen, nicht hygroskopischen Krystallen. Diese bilden viereckige schiefwinkelige, oft sehr dünne Tafeln. Bedeckt man einzelne Knollen oder Krystallbüschel des Chlorids mit wenig kalter Natronlauge, so überziehen sie sich sofort mit einem dichten schnell wachsenden Krystallrasen. Charakteristisch sind Zwillingsskrystalle: dachförmig zugespitzte, von einem feinen Längsstrich durchzogene prismatische Gestalten. Abstumpfungen, Durchwachsungen, Büschelbildungen sind häufig. Nach Kossel bilden die Tafeln Winkel von 79 und 101°; sie sind doppelbrechend, ihre Auslöschrichtungen bilden mit den längeren Seiten des Vierecks Winkel von 14,6 und 75,4°. Die Krystalle trüben sich in mässiger Wärme unter Krystallwasserverlust, schmelzen aber erst über 300°. Sie lösen sich nicht in konzentrierter Lauge, aber mit alkalischer Reaktion etwas schwer in Wasser, leichter in der Wärme; sie lösen sich auch in Mineralsäure und in Ammoniak, nach dem Verdunsten des Ammoniaks bleibt die Verbindung unverändert zurück. Beim Neutralisieren ihrer Lösung mit Mineralsäuren oder organischen Säuren, auch mit Kohlensäure, scheidet sich das H. amorph oder in krystalloiden Knollen aus; saure Salze (Kalium- und Natriumpyrophosphat, zweifach saures Kaliumphosphat, Borax, saures weinsaures Ammon, saures Kalium- und Natriumcarbonat) fällen die Basis gleichfalls; in der Lösung oder Aufschwemmung eines dieser Salze trüben sich Krystalle des H.-Natrons an der Oberfläche und verwandeln sich in amorphe knollige Massen, welche die noch unveränderte Verbindung einhüllen. Frischer Harn zerlegt die Krystalle schnell, wie die Lösung eines sauren Salzes. Ammonsalze scheiden die reine Basis ab (S., B. u. G.). — Löst man nach Bondzyński und Gottlieb die Basis in heisser überschüssiger Natronlauge (2 At. Na auf 1 Mol.), so krystallisieren zentimeterlange rhombische Tafeln und Säulen aus.

Auch die Kaliumverbindung krystallisiert gut, besitzt einen hohen Schmelzpunkt, löst sich leichter als das Natriumsalz und zersetzt sich ebenso wie dieses (G.).

<sup>1</sup>) P. Balke, Journ. f. prakt. Ch. [2] 47. 545. 1893.

<sup>2</sup>) G. Salomon, Virchows Arch. 125. 556. 1891.



— Chlorbarium gibt mit der Natronverbindung einen gallertigen Niederschlag, aus dessen Lösung in heissem Wasser sich Kugeln und Rosetten der Verbindung  $(C_6H_5N_4O_2)_2Ba$  (bei 100—105°) ausscheiden; man erhält die Krystalle auch direkt aus der Basis und Bariumhydrat (G. u. B.). — Während Bleizucker die Basis leicht löst, gibt Bleiessig mit ihr, namentlich bei Zusatz einer Spur Ammoniak, einen starken Niederschlag (A.). — Mit Kupferoxydul gibt sie eine schwer lösliche oder unlösliche Verbindung (Balke, B. u. G.). Kupfersulfat und Bisulfat gibt bei schwachem Erwärmen mit der Basis noch in einer Verdünnung von 1: 50 000 einen deutlichen flockigen Niederschlag, Kupfersulfat und Thiosulfat fällt nur in der Wärme. Der mit ammoniakalischer Silberlösung erhaltene Niederschlag ist in Ammoniak unlöslich. Nach dem Trocknen hat der Niederschlag die Zusammensetzung  $C_6H_6N_4O_2 \cdot Ag_2O$ . Kupferacetat gibt beim Kochen einen schmutzig weissen Niederschlag.

b) Mit Säuren. Von den Verbindungen mit Säuren ist das Chlorid ausgezeichnet durch seine verhältnismässige Schwerlöslichkeit und vollkommene Krystallisationsfähigkeit. Die wasserhellen, meist in Büscheln angeordneten Krystalle erreichen eine Länge bis 1 cm. Sie werden in Wasser sehr bald weiss und undurchsichtig und zersetzen sich schliesslich unter Abscheidung von Heteroxanthin, schneller in der Wärme (S., A.). Ein analysenreines Salz zu erhalten, gelang B. u. G. nicht, es verliert schon im Wasserbad Salzsäure. Das Nitrat ist schwerer löslich als das Chlorid und krystallisiert aus 10 %iger Salpetersäure in rhombischen Plättchen, deren Längsseiten nach aussen gebogen sind.

c) Mit Salzen. Quecksilberchlorid schlägt nach Salomon<sup>1)</sup> das Heteroxanthin, im Gegensatz zum Paraxanthin, sofort nieder. Auch Mercurinitrat fällt es (A.). — Durch salpetersaures Silber wird die Basis sowohl aus salpetersaurer wie aus ammoniakalischer Lösung flockig gefällt; der Niederschlag löst sich beim Erwärmen schon in sehr verdünnter Salpetersäure und aus der nicht zu konzentrierten Lösung setzen sich sehr gut ausgebildete tafelförmige und prismatische Krystalle von salpetersaurem Heteroxanthin - Silber ab (S.). Die Verbindung mit Silbernitrat fällt aus Salpetersäure von 1,1 Dichte als schweres, aus rhombischen Plättchen und häufig zu zweien durchwachsenen Prismen bestehendes Pulver; sie ist leichter löslich als die entsprechende Xanthinverbindung.

5. Das Silbersalz liefert mit Methyljodid Kaffein.

6. Zersetzungen: Zersetzt sich nach Krüger und Salomon<sup>2)</sup> beim Erhitzen mit rauchender Salzsäure auf 180—200° zu Sarkosin, Ammoniak, Kohlensäure und Kohlenoxyd nach



Von Permanganat wird es zu Methylamin, Harnstoff und Ammoniak oxydiert<sup>3)</sup>.

Nachweis:

Gibt die Xanthinprobe nicht, dagegen eine intensive Weidelsche Reaktion (S., B. u. G., A.), mit Salzsäure und einer Spur Kaliumchlorat besser als mit Chlor oder Brom; der rote Rückstand wird mit Kalilauge violett.

Darstellung: Aus Harn (s. S. 997, Aufteilung der Gesamtpurinfällung).

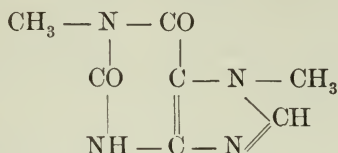
<sup>1)</sup> Salomon, Berichte d. chem. Gesellsch. 18. 3408. 1885; Virchows Arch. 125. 555.

<sup>2)</sup> Krüger und Salomon, Zeitschr. f. physiol. Ch. 21. 169.

<sup>3)</sup> Jolles, B. B. 33. 2120. 1900.

## 10. Paraxanthin.

1-7-Dimethyl-2-6-dioxy-purin.  $C_7H_8N_4O_2$ . Mol.-Gew. 180,10. C = 46,67%; H = 4,44%; N = 31,11%.



Vorkommen: Das Paraxanthin hat Thudichum und selbständig vor diesem Salomon im Harn des Menschen entdeckt.

Thudichum nannte die dem Theobromin isomere Substanz Urotheobromin. Aus 10 000 Liter Menschenharn stellten Krüger und Salomon 12,5 g Paraxanthin dar, doch gewann Salomon schon aus 20 Liter mässig konzentrierten Harns einige Dutzend makroskopische Krystalle und hat es nach späterer Mittheilung selbst in 0,84—5,37 Liter Harn häufig, aber nicht immer, noch aufgefunden; 5 Liter Harn lieferten bis 10 mg desselben. In etwa 6,3 Liter leukämischen Harns dagegen, aus welchem Salomon das Heteroxanthin darstellte, war keine Spur Paraxanthin nachweisbar. Ebenso wenig konnte es von Salomon<sup>1)</sup> in 60 Liter Kuhharn aufgefunden werden.

Synthese: Aus Dimethylharnsäure, aus Kaffein, aus 1-7-Dimethyl-6-oxy-2-chlorpurin durch Erhitzen mit HCl auf 125° (E. Fischer<sup>2)</sup>).

## Eigenschaften:

1. Farblose glasglänzende, meist sechsseitige Tafeln, die 3—4 mm breit und 2—4 cg schwer werden. Ganz konzentrierte Lösungen erstarren zu einem Brei langer farbloser durcheinander gewirrter Nadeln, welche trocken den Seidenglanz des Tyrosins besitzen.

2. Krystallisiert nach Salomon<sup>3)</sup> bei schneller Abscheidung aus heisser konzentrierter Lösung wasserfrei in Nadeln. Kann auch wasserhaltig krystallisieren. Die wasserhaltigen Krystalle verlieren das Wasser bei 110°. Es sublimiert bei 170—180°, schmilzt zwischen 250 und 270° anscheinend ohne Zersetzung und erstarrt beim Erkalten glasig. In noch höherer Temperatur entwickelt es nach Isonitril riechende Dämpfe, schwärzt sich und verbrennt.

3. In kaltem Wasser schwer löslich, viel leichter in heissem; die Lösungen reagieren neutral. Nach Salomon löst es sich in der Kälte weder in Alkohol, noch in Äther; nach Thudichum ist es in heissem Alkohol löslich.

4. Verbindungen: a) Mit Basen: Die schwer lösliche Natriumverbindung erhält man nach Salomon<sup>4)</sup> auf dieselbe Weise wie die des

<sup>1)</sup> J. L. W. Thudichum, *Annals of chemical medicine* **1**. 163. 1879; *Grundzüge der anat. u. klin. Chem.* Berlin 1886. 245; *Comptes rendus* **106**. 1805. 1888. — Salomon, *Du Bois' Arch.* 1882. 426; *Berichte d. chem. Gesellsch.* **16**. 195. 1883; *Zeitschr. f. klin. Med.* **7**. Suppl.-Heft 63. 1884; *Berichte* **18**. 3406. 1885. — M. Krüger und G. Salomon, *Zeitschr. f. physiol. Ch.* **21**. 169. 1895. — Salomon, *Virchows Arch.* **125**. 565. 1891.

<sup>2)</sup> B. B. **30**. 2408. 1897.

<sup>3)</sup> Salomon, *Zeitschr. f. physiol. Ch.* **15**. 319. 1891.

<sup>4)</sup> Salomon, *Virchows Arch.* **125**. 534. 1891.

Heteroxanthins in rechtwinkeligen, meist länglichen Tafeln und Prismen. Ein Paraxanthinkrystall wird in einem Tröpfchen Natronlauge oder Sodalösung sofort weiss und undurchsichtig und löst sich, während gleichzeitig das Natronsalz auskrystallisiert. Die Krystalle sind nach Kossel doppelbrechend, ihre Auslöschrichtungen liegen den Seiten des Rechtecks parallel. Das Paraxanthin-Natron besitzt dieselben allgemeinen Eigenschaften wie das Heteroxanthin-Natron, löst sich aber etwas leichter in Wasser. In Lösungen oder Aufschwemmungen saurer Salze schmilzt das Paraxanthin-Natron langsam ein, während zugleich das freie Paraxanthin in seinen typischen Formen auskrystallisiert. — Das Kaliumsalz verhält sich wie das Natriumsalz, nur ist es leichter löslich. Mit Kupferoxydul vereinigt sich das Paraxanthin zu einer schwerlöslichen oder unlöslichen Verbindung.

b) Mit Säuren. Das Chlorid des Paraxanthins krystallisiert auch aus sehr konzentrierten Lösungen nur schwer. — Das Platinchlorhydrat krystallisiert leicht in orangefarbenen Nadeln, welche beim Trocknen über Schwefelsäure schnell in ein gelbes Pulver zerfallen. Das Chloraurat krystallisiert mit  $\frac{1}{2}\text{H}_2\text{O}$  und schmilzt bei 227 bis 228°. — Das Nitrat ist unbeständig. — Mit Pikrinsäure gibt salzsaures Paraxanthin einen reichlichen Niederschlag von dicht verfüzten gelben Flittern; das Salz zersetzt sich aber beim Auflösen in Wasser und beim Eindampfen.

c) Mit Salzen. Quecksilberchlorid oder Merkurinitrat fallen nach Salomon<sup>1)</sup> das Paraxanthin im Gegensatz zum Heteroxanthin erst nach längerer Zeit und erst bei Zusatz von überschüssigem Reagens. Sublimat ruft so ein Haufwerk farbloser Prismen hervor, die sich leicht in heissem Wasser lösen, sich bei mässigem Erwärmen unter Verlust des Krystallwassers trüben und bei starkem Erhitzen übelriechende ekelerregende Dämpfe entwickeln. — Silbernitrat fällt die Lösung des Paraxanthins in Salpetersäure oder Ammoniak flockig und gallertig, konzentrierte Lösung gibt mit salpetersaurem Silber eine klare Gallerte. Die Lösungen der Niederschläge in warmer Salpetersäure setzen beim Erkalten makroskopische weisse seidenglänzende Krystallbüschel von salpetersaurem Paraxanthin-Silber ab.

Darstellung: Aus Harn aus der Hypoxanthinfraktion von Krüger und Salomon.

Nachweis: Gibt die Weidelsche Probe aber nicht die Xanthinreaktion.

## II. Quantitative Bestimmung der Purinbasen.

Behufs quantitativer Bestimmung der Purinbasen geht man zunächst genau so vor, wie zur Bestimmung des gesamten Purin-Stickstoffes (S. 940). Aus den durch Silber- oder Kupferoxydulfällung erhaltenen Niederschlägen scheidet man das Purinstoffgemenge am besten durch Zerlegen der Niederschläge in der Siedehitze mit Schwefelwasserstoff ab. Die Verwendung von Natriumsulfid ist mindestens überflüssig und kann einen Teil der Purinstoffe zerstören. Man bringt die Niederschläge am besten mit dem Filter in den Kolben zurück, setzt etwa die Hälfte der in Arbeit genommenen Harnmenge an Wasser zu, verteilt das Filter durch heftiges Schütteln, erhitzt mit etwas verdünnter Salzsäure zum Sieden und leitet bis zur völligen Zersetzung

<sup>1)</sup> Salomon, Zeitschr. f. klin. Med. Suppl.-Bd. 7. 73; Virchows Arch. 125. 555.



Schwefelwasserstoff ein. Hierbei wird das Kupferoxydul gut abgeschieden, das Silbersulfid dagegen bleibt leicht kolloid. Um das zu vermeiden, setzt man nach Folin und Shaffer<sup>1)</sup> 5—10 ccm Kupfersalzlösung vor dem Einleiten von Schwefelwasserstoff zu. Die Autoren empfehlen Kupfersulfat. Für den Fall, dass man aber die dann erhaltene Lösung zur Trockne verdampfen will, muss man die Schwefelsäure vermeiden und wird zweckmässig Kupferacetat verwenden. Nach der völligen Zersetzung kocht man den überschüssigen Schwefelwasserstoff weg (es wird so lange gekocht, bis ein in die Dämpfe gehaltenes, mit Silber- oder Bleilösung befeuchtetes Stück Filtrierpapier nicht mehr geschwärzt wird). Man filtriert heiss, zweckmässig auf der Nutsche und wäscht gründlich aus. Beim Einengen des mit Salzsäure angesäuerten Filtrats fällt die Harnsäure aus, wird abfiltriert und gewaschen. Nach Krüger kann man den Silberniederschlag auch mit Salzsäure zerlegen<sup>2)</sup>, wobei die meiste Harnsäure mit dem Silberchlorid auf dem Filter zurückbleibt. Auch hier ist aber das Filtrat einzuengen und von der noch stets ausfallenden Harnsäure abzufiltrieren. Ist viel Xanthin und wenig Harnsäure — wie in manchen Tierharnen — zugegen, so kann hierbei auch ein Teil des Xanthins ausfallen. Man verfährt dann so, dass man zur Trockne verdampft, den Rückstand in konzentrierter Schwefelsäure löst und die Lösung in Wasser (Horbaczewski<sup>3)</sup>) eingiesst. Vielleicht ist hierzu auch das Verfahren von Kossa<sup>4)</sup> geeignet, welches die Lösung in Schwefelsäure mit Alkohol behandelt. Die Harnsäure fällt aus, die Purinbasen bleiben in Lösung. Nur bei Verwendung von Alkohol ist aber die Trennung absolut, denn die Harnsäure ist, wenn auch sehr wenig, auch in verdünnter Schwefelsäure löslich.

Niemilowicz entfernt die Harnsäure aus dem nativen Harn durch Permanganatoxydation (s. S. 982), Kennaway durch Fällung mit Ammonsalz (s. S. 982).

Hat man auf die eine oder andere Weise eine Trennung der Harnsäure von den Basen vorgenommen, so wird die Mutterlauge der Harnsäure, in der neben den Basen also noch meist geringe Mengen von Harnsäure vorhanden sind, noch einmal mit ammoniakalischer Silberlösung oder Kupfersulfat und Bisulfit gefällt. Vor der neuerlichen Fällung mit Kupfersulfat und Bisulfit werden die Harnsäurespuren zusammen mit den gleichzeitig durch die Reagentien gefällten Stoffen (Rhodan, Kynurensäure, Eiweiss etc.)

<sup>1)</sup> Zeitschr. f. ph. Ch. **32**. 553. 1901.

<sup>2)</sup> Ebenda, **16**. 162, **21**. 175.

<sup>3)</sup> Ebenda, **18**. 343. 1893.

<sup>4)</sup> Ebenda, **47**. 1. 1906.



durch Oxydation des Gemenges mit Braunstein befreit. Den Silberniederschlag behandelt man genau nach Camerer-Arnstein (s. S. 987). Den Kupferoxydulniederschlag kann man nach dem gründlichen Waschen direkt nach Kjeldahl verarbeiten. Man erhält so den Purinbasen-N.

Statt in den Niederschlägen den Stickstoff zu bestimmen, kann man die vorhandene Basenmenge auch durch die Bestimmung des Kupfer- bzw. Silbergehaltes der Niederschläge messen. Die Kupferoxydulverbindungen sind dazu wenig geeignet, da sie zumeist mit Kupferoxydul verunreinigt sind, dagegen erhält man bei der Silberbestimmung gute Resultate. 1 Atom Silber entspricht  $\frac{1}{2}$  Mol. Basen, also, wenn von den Aminopurinen abgesehen wird, ist ein Äquivalent Silber, Chlorsilber oder Rhodansalz zwei Atomen Basen-N äquivalent. Man erfährt also durch die Silberbestimmung des Niederschlages bloss den Purin-Kern-N. Der Amino-N der Aminopurine wird bei dieser Art der Berechnung nicht bestimmt und lässt sich auch nicht berechnen, da im Harn ein Gemisch von Amino- und desamidierten Purinen vorliegt, in dem die Aminopurine aber nur einen sehr kleinen Teil ausmachen. Da der Amino-N der Aminopurine als Purin-N deshalb nicht anzusehen ist, weil er im Stoffwechsel theoretisch vollständig abgespalten wird und die geringen Mengen Aminopurin des Harns nur einen der Umsetzung entgangenen Rest, ein Intermediärprodukt, darstellen, wird er bei der Ausrechnung der Bilanzen vom Purin-N der Zufuhr in Abzug gebracht und die in den Harn übergehenden, nicht desaminierten Reste müssten folgerichtig ebenso behandelt werden. Eine gesonderte Bestimmung der geringen Mengen Aminopurin im Harn und damit die Berücksichtigung des Amino-N in der Basenausscheidung ist derzeit unmöglich. Die Bestimmung des Silbers im Basenniederschlag und die Gleichsetzung eines Silberäquivalents zwei Purinbasen-N-äquivalenten ist also theoretisch richtiger als die direkte Bestimmung des Basen-N nach Kjeldahl, welche den etwa vorhandenen Amino-N mitbestimmt. In Praxi werden sich allerdings zumeist keine Unterschiede zwischen den beiden Werten ergeben dürfen, da die Menge der ausgeschiedenen Aminopurine eine nur sehr geringe ist.

In der entsprechenden Harnsäureverbindung entfällt auf 1 Mol. Harnsäure ein Atom Silber. Ein Äquivalent Silber, Chlorsilber oder Rhodan ist daher 4 Atomen Harnsäure-N äquivalent.

1 ccm einer  $n_{10}$ -Lösung entspricht also 0,0056 Harnsäure-N und 0,0028 Purinbasen-Kern-N.

Schliesslich kann man die Menge der Purinbasen auch indirekt durch Bestimmung des Gesamtpurin-N, gesonderte Bestimmung der Harnsäure und Subtraktion beider Werte ermitteln.

In allen Fällen muss zur Bestimmung eiweissfreier oder enteiweisster Harn verwendet und alle Momente beobachtet werden, die bei der Bestimmung des Gesamt-Purin-N, als die Genauigkeit der Resultate beeinflussend, Erwähnung gefunden haben.

Die Menge der im Harn auftretenden Xanthinbasen ist sehr gering. Wenn man den auf die Xanthinbasen entfallenden Stickstoff als Xanthin rechnet, so enthält die Tagesmenge Harn nach Camerer bei gemischter Kost 87 mg Xanthin, bei animalischer Kost 44 mg, bei vegetabilischer 72 mg (Erbsen und Kraut) und 111 mg (Kohl und Äpfel). Setzt man den Stickstoff der in diesen Versuchen gleichzeitig ausgeschiedenen Harnsäure = 100, so beträgt der Stickstoff der Xanthinbasen bei den vier Ernährungsweisen 18,1, 7,6, 18,1 und 35,8. Salkowski bestimmte Harnsäure und Xanthinbasen gesondert im Silberniederschlag; nach ihm machen sie 8–10% von der Menge der Harnsäure aus. Nach Flatow und Reitzenstein<sup>1)</sup> kommen im Liter Harn 19,8 mg (12,9–34,7) und in der Tagesmenge 29,2 mg (15,6–45,1) Xanthinbasen vor.

Aus 10 000 Litern Menschenharn stellten Krüger und Salomon<sup>2)</sup> dar: 10,12 Xanthin, 8,51 Hypoxanthin, 3,54 Adenin, 3,40 Epiguanin, 31,32 5-Methylxanthin, 22,35 Heteroxanthin und 15,32 Paraxanthin. Davon sind die methylierten Xanthine und möglicherweise auch das Epiguanin exogenen Ursprungs. Der endogene Purinbasen-N des Menschenharns schwankt pro 24 Stunden von 4–27 mg (Burian und Schur l. c.).

## Direkte Verfahren.

### 1. Durch Fällern als Silbersalz.

#### a) Nach Salkowski.

A. Prinzip. Nach Abscheidung der Phosphorsäure durch Magnesiamischung werden die Harnsäure und die Xanthinbasen durch ammoniakalische Silberlösung gefällt, der Niederschlag mit Schwefelwasserstoff zerlegt, die Xanthinbasen von der Harnsäure durch verdünnte Schwefelsäure getrennt, die in schwefelsaurer Lösung befindlichen Xanthinbasen wieder mit ammoniakalischer Silberlösung abgeschieden und in diesem Niederschlag das Silber bestimmt. Aus der gefundenen Menge Silber wird die Menge der Xanthinbasen berechnet.

<sup>1)</sup> Camerer, Ztschr. f. Biol. 28. 72. 1891. — Salkowski, Zentralbl. f. d. med. Wissensch. 1894. 514. — R. Flatow u. A. Reitzenstein, Deutsche med. Wochenschr. 23. 1897.

<sup>2)</sup> Zeitschr. f. physiol. Chem. 24. 380. 391. 1898.

<sup>3)</sup> Zeitschr. f. exp. Path. u. Th. 4. 517. 1907.

In der Beschreibung hat Huppert einige ihm zweckmässig erscheinende, an sich unwesentliche Änderungen vorgenommen.

#### B. Erfordernisse.

1. Magnesiamischung nach Ludwig, S. 1052.
2. Eine 3 %ige Silberlösung, oder die ammoniakalische Silberlösung nach Ludwig a. a. O.
3. Auf das dreissigfache ihres Gewichtes verdünnte Schwefelsäure. Man erhält sie durch Zusatz von 10 ccm englischer Schwefelsäure zu 550 ccm Wasser.
4. Fünzigstel-Normal-Rhodanammonlösung. Sie wird auf 0,02 n Silberlösung (mit 3,4 g Silbernitrat im Liter) gestellt. Der Kubikzentimeter derselben zeigt 1,52 mg Xanthin oder 0,56 mg Purinbasen-N an.

C. Ausführung. Eine grössere Menge (bei mittlerer Dichte 0,5 l) eiweissfreier Harn wird in einem Masszylinder auf 100 ccm mit 10 ccm Magnesiamischung versetzt und mit starkem Ammoniak auf ein rundes Volumen aufgefüllt (0,5 l auf 0,6 l). Nach einigen Minuten filtriert man durch ein trockenes Faltenfilter, misst vom Filtrat ein rundes Volumen (540 ccm mit 450 ccm Harn) ab und vermischt es auf 100 ccm mit 6 ccm der 3%igen wässerigen oder 10 ccm der ammoniakalischen Silberlösung. Der Niederschlag soll durchscheinend und gallertig sein; ist er weiss, so enthält er noch Chlorsilber und dieses ist dann durch Zusatz von Ammoniak noch in Lösung zu bringen. Bei Verwendung der wässerigen Silberlösung hat man überdies nachzusehen, ob die Mischung Silber enthält, wozu eine abgehobene klare Probe mit Salpetersäure zu übersättigen ist.

Nachdem der Niederschlag ungefähr eine Stunde gestanden hat, bringt man ihn auf ein glattes Filter und wäscht ihn silberfrei; ihn auch nahezu chlorfrei zu waschen, wie Salkowski vorschreibt, ist überflüssig. Man spritzt ihn dann vollständig vom Filter in einen Kolben, versetzt die Flüssigkeit, deren Volumen gleich dem des verwendeten Harns sein kann, mit einigen Tropfen Salzsäure und zerlegt ihn unter häufigem Schütteln vollständig mit Schwefelwasserstoff; der Zusatz der Salzsäure geschieht deshalb, weil sonst leicht Schwefelsilber mit in das Filtrat übergeht. Alsdann erhitzt man den Kolben auf dem Wasserbad, filtriert, wäscht den Niederschlag aus und verdampft das Filtrat anfangs über freiem Feuer, später im Wasserbad zur Trockne.

Statt mit Schwefelwasserstoff kann man den Niederschlag, wie bei der Bestimmung der Harnsäure nach Ludwig (in Wasserbadwärme) mit Schwefelnatrium zerlegen und Filtrat und Waschwasser nach dem schwachen Ansäuern mit Schwefelsäure zur Trockne verdampfen. Vergleichende Bestimmungen, welche Schrader <sup>1)</sup> nach beiden Methoden ausgeführt hat, sprechen für die Verwendbarkeit dieses Verfahrens.

<sup>1)</sup> Schrader, bei Salkowski, a. a. O. 301.

Der trockene Rückstand wird darauf mit 25–30 ccm der verdünnten Schwefelsäure bis zum beginnenden Sieden erhitzt, die Flüssigkeit 16–20 Stunden stehen gelassen, die Harnsäure, welche sich abgeschieden hat, mit Hilfe des Filtrats auf ein kleines Filter gebracht und dieses mit der verdünnten Schwefelsäure gewaschen, wozu ein 2–3 maliges Aufgiessen der Säure genügt. Filtrat und Waschflüssigkeit brauchen nicht mehr als 50 ccm zu betragen. Man übersättigt mit Ammoniak, fällt abermals mit Silberlösung und wäscht den Niederschlag auf einem aschefreien Filter nun chlor-, silber- und schwefelsäurefrei. Das Filter wird getrocknet, im Porzellantiegel verbrannt, das gebildete Silber in chlorfreier Salpetersäure gelöst, wie S. 1047 angegeben, und seine Menge durch Titrieren mit der 0,02-n-Rhodanlösung ermittelt.

Die Bestimmung ist nicht völlig genau, weil eine kleine Menge der Harnsäure von der Schwefelsäure in Lösung erhalten wird (Sal-kowski), die Verbindung der Xanthinbasen mit Silberoxyd in Ammoniak nicht ganz unlöslich ist, und weil sich nicht alles Silber in der Salpetersäure vollständig löst; Parallelanalysen ergeben aber bei sorgfältiger Arbeit bis auf Bruchteile von Milligrammen gleiche Resultate.

Um die weitere Untersuchung des Basenniederschlages bzw. Basengemenges mit der quantitativen Bestimmung der Basen zu verbinden, kann man nach Bass (unveröffentlicht) den Silberniederschlag der Basen nach sorgfältigem Waschen (er muss chlo Silberfrei sein) unter Zusatz von etwas Kupfersulfat zur Vermeidung der kolloiden Lösung des Silbersulfids (Folin und Shaffer) mit Schwefelwasserstoff zerlegen, die Sulfide quantitativ auf einem Filter sammeln, veraschen (zweckmässig feucht nach Neumann oder im Tiegel) und in der erhaltenen Lösung wie oben das Silber titrieren. Im Filtrat von den Sulfiden kann man dann eine weitere Untersuchung der Basen vornehmen.

#### b) Im Anschluss an die Harnsäurebestimmung nach Ludwig.

Man verfährt genau wie zur Harnsäurebestimmung nach Ludwig (S. 1051). Mutterlauge und Waschwässer der Harnsäure werden mit Ammoniak alkalisch gemacht. Von einem hierbei etwa ausfallenden Niederschlage (Tripelphosphat) ist abzufiltrieren und für die weitere Verarbeitung ein aliquoter Filtratsteil zu nehmen. Die alkalische Lösung wird nun wieder mit ammoniakalischer Silberlösung gefällt, der Niederschlag ammoniakfrei gewaschen und nach Camerer-Arnstein (s. S. 941) weiterbehandelt. Man erhält so unmittelbar den gesamten Purinbasen-N.

Statt nach Ludwig vorzugehen, kann man von vornherein das Verfahren von Camerer-Arnstein zur Bestimmung des Gesamt-



purin-N befolgen. Der nach Camerer<sup>1)</sup> erhaltene Silberniederschlag wird gut gewaschen, mit Schwefelwasserstoff zerlegt und zur Trockne verdampft. Hierbei flockt das meist nach der Zerlegung kolloid gelöste Silbersulfid aus. Digeriert man den Rückstand mit Wasser, so geht neben den Basen auch die Harnsäure vollständig als Magnesiumsalz in Lösung, digeriert man dagegen mit verdünnter Schwefelsäure oder Salzsäure, so bleibt sie zurück. Die Lösung wird dann mit Ammoniak wieder alkalisch gemacht, mit ammoniakalischer Silberlösung gefällt und mit dem Niederschlage wie oben verfahren.

#### c) Nach Kennaway<sup>1)</sup>.

Im Harn wird die Harnsäure nach dem Verfahren von Folin-Shaffer als Ammonurat niedergeschlagen und das Filtrat samt Waschwässern (siehe S. 1062) mit ammoniakalischer Silberlösung genau wie bei dem Verfahren von Camerer-Arnstein gefällt, der Niederschlag mit Wasser ammoniakfrei gewaschen, mit Magnesia gekocht und der Stickstoffbestimmung nach Kjeldahl unterworfen.

Die nach a, b, c erhaltenen Silberverbindungen der Basen kann man auch in Salpetersäure lösen, ihren Silbergehalt direkt durch Titration mit Rhodanlösung (n/50) bestimmen und nach S. 978 auf Basen-N umrechnen.

#### d) Nach Niemilowicz<sup>2)</sup>.

Prinzip. Die im Harn vorhandene Harnsäure wird durch Permanganat oxydiert und dann die Purinbasen durch ammoniakalische Silberlösung niedergeschlagen, der Niederschlag gewaschen, in Salpetersäure gelöst und das Silber nach Volhard titriert, oder nach dem Verfahren von Denigès die Basen durch Zurücktitrieren des Silberüberschusses bestimmt.

Erfordernisse.

1. 16,66 % Phosphorsäure.
2. 0,5 % Indigocarminlösung, 1 cem braucht zur Entfärbung 0,33 cem. n/10 Permanganatlösung,
3. n/10 Kaliumpermanganatlösung.
4. Natriumsulfit.
5. Magnesiamischung nach Ludwig (S. 1052).
6. Ammoniakalische Silberlösung nach Ludwig (S. 1052), bzw. die Silbermagnesiamischung und die anderen Reagentien nach Denigès (S. 1048).
7. n/50 Rhodansalzlösung.
8. Käufliche Wasserstoffsperoxydlösung (4%)

Ausführung. 100 cem Harn werden mit der Phosphorsäure bis zur kongosauren Reaktion versetzt. Hierauf gibt man 1 cem Indigocarminlösung zu und titriert mit der Permanganatlösung bis zum Verschwinden der Färbung des Indicators. Man verbraucht mehr als die zur Entfärbung von 1 cem Indigocarminlösung erforderlichen 0,33 cem. Man gibt wieder 1 cem Indigocarminlösung zu und titriert wieder, jetzt wird weniger Permanganat, aber immer noch etwas mehr als 0,33 cem gebraucht. Der Vorgang wird ein drittes Mal wiederholt, wobei dann ungefähr bloss die zur Entfärbung der Indigocarminlösung nötigen 0,33 cem verbraucht werden. Die zu diesem Punkte verbrauchte Permanganatmenge in Kubik-

<sup>1)</sup> Journ. of ph. 38. 1. 1909.

<sup>2)</sup> Zeitschr. f. ph. Ch. 35. 264. 1902.

zentimetern bezeichnet Niemilowicz als Bruttooxydationszahl. Hierbei ist nun alle Harnsäure oxydiert. Jetzt gibt man 1 cem frisch bereiteter 10% Natriumsulfitlösung oder eine geringe Menge Sulfit in Substanz, 1,5–2 cem Ammoniak und genau 75 cem Silbermagnesiummischung nach Denigès (S. 1048) zu, bringt auf ein rundes Volumen, eventuell unter Zusatz von 2 cem der Wasserstoffsuperoxydlösung und verfährt weiter nach Denigès. 1 cem Silberlösung = 1,9 mg Xanthin. Oder man versetzt eine grössere Harnmenge ohne Indicator mit der berechneten Menge Permanganatlösung, konzentriert, fällt die Basen mit den Ludwigschen Reagentien und titriert das Silber des in Salpetersäure gelösten Niederschlags. Zu diesem Ende hat man zunächst aus der Bruttooxydationszahl durch Abziehen der für den Indicator verbrauchten Permanganatmenge die Nettooxydationszahl zu ermitteln. Diese soll annähernd 8 betragen. Beträgt sie mehr, so hat man nach der Formel Netto: 7 = Verdünnung den Harn zu verdünnen. In dieser Verdünnung bestimmt man genau wie früher die Nettooxydationszahl (korrigiertes Netto). Diese Menge setzt man nun ohne Indicator zusammen mit der entsprechenden Menge Phosphorsäure, die man aus dem ersten Versuche berechnet, einer grösseren Harnmenge, 500 cem, zu dann 1 cem 10% Bisulfit und dampft auf dem Wasserbade bis zu einer dem spezifischen Gewicht des Harns entsprechenden Konzentration ein, und zwar bis auf 20 + den 3 Dezimalen des spezifischen Gewichts Kubikzentimeter. Die konzentrierte Lösung wird mit Ammoniak alkalisch gemacht und gemessen. Man filtriert von den ausgefallenen Erdsphosphaten ab, versetzt  $\frac{9}{10}$  der Lösung an Filtrat auf je 25 cem mit 2 cem Ammoniak, auf je 50 cem mit 1 cem Wasserstoffsuperoxydlösung und dann mit 5–10 cem ammoniakalischer Silberlösung nach Ludwig und 5 cem Magnesiummischung nach Ludwig. Der Niederschlag wird auf einem Filter gesammelt, chlor- und silberfrei gewaschen, in verdünnter Salpetersäure gelöst und mit der Rhodanlösung unter Zusatz von Eisenammonalaun als Indicator bis zur ersten Braunfärbung der Lösung titriert. 1 cem der n/50 Rhodanlösung zeigt 1,69 mg Xanthin an oder unter der Voraussetzung, dass keine Aminopurine zugegen sind bzw. unter Vernachlässigung des Amino-N etwa anwesenden Guanins oder Adenins 0,56 mg Purinbasen-N an.

Nach Gittelmacher-Wilenko<sup>1)</sup> liefert die Methode mit der von Salkowski übereinstimmende Resultate.

## 2. Durch Fällen als Kupferoxydulsalz nach Krüger und Schmid<sup>2)</sup>.

Man geht genau so vor wie zur Bestimmung des Gesamturin-N nach dem Kupferoxydulverfahren (S. 946). Ausser den dort aufgezählten Erfordernissen braucht man noch eine Aufschwemmung von Braunstein, die man sich in der Weise herstellt, dass man eine 0,5%ige Lösung von Kaliumpermanganat heiss mit soviel Alkohol versetzt, bis Entfärbung eintritt. Die Aufschwemmung ist vor dem Gebrauche zu schütteln.

Der wie oben S. 947 gewonnene Niederschlag der Kupferoxydulverbindungen der Purine wird nach dem gründlichen Waschen durch Schwefelwasserstoff zerlegt, der Schwefelwasserstoff weggekocht, vom Kupfersulfür abfiltriert und das letztere gründlich gewaschen. Filtrat und Waschwasser werden mit ein wenig Salzsäure in einer gerandigten Krystallisierschale auf ein kleines Volumen eingedampft und die aus-

<sup>1)</sup> Zeitschr. f. ph. Ch. 36. 20. 1902.

<sup>2)</sup> Zeitschr. f. ph. Ch. 45. 1. 1905.

gefallene Harnsäure nach einigem Stehen abfiltriert und ausgewaschen. Die so erhaltene Basenlösung wird mit Lauge alkalisch und mit Essigsäure wieder sauer gemacht, auf 70–80° erwärmt, noch etwas Essigsäure hinzugesetzt und mit 10 ccm der Braunsteinsuspension kurze Zeit digeriert. Hierauf bringt man den Braunstein durch 50 ccm Bisulfitlauge in Lösung, erhitzt zum Sieden und trägt wie vorher 5–10 ccm 10%ige Kupfersulfatlösung ein, erhält noch 3 Minuten im Sieden, bringt den Niederschlag auf ein Filter, wäscht ihn gründlich aus und bestimmt in ihm den Stickstoff nach Kjeldahl.

Man kann auch so vorgehen, dass man nach dem Abtrennen der Harnsäure, nach b) mit ammoniakalischer Silberlösung und Magnesiämischung die Basen niederschlägt und weiter dem Gange von Camerer-Arnstein folgt.

### 3. Durch Fällen mit Phosphorwolframsäure.

Will man die Xanthinbasen, wie Stadthagen sowie Baginsky<sup>1)</sup> getan haben, mit Phosphorwolframsäure abscheiden, so hat man dazu das Verfahren von Hofmeister zu befolgen. Bei der Behandlung des Niederschlags mit Bariumhydrat bleibt zwar die Harnsäure ganz oder fast ganz ungelöst, man ist aber dadurch einer Trennung derselben von den Xanthinbasen nicht überhoben. Sie kann nach dem Verfahren von Salkowski oder dem von Horbaczewski oder Wulff vorgenommen werden (S. 993). Da die Verbindungen der Xanthinbasen mit Baryt schwer löslich sind, so muss die barythaltige Flüssigkeit verdünnt sein, um einem Verlust an Xanthinbasen vorzubeugen. Zuletzt sind sie durch Digestion mit ammoniakalischer Silberlösung in das Silbersalz überzuführen.

Der Harn wird nach Hofmeister<sup>2)</sup> abwechselnd mit soviel Salzsäure und Phosphorwolframsäure versetzt, bis kein Niederschlag mehr entsteht, der Niederschlag nach 24stündigem Stehen mit verdünnter Schwefelsäure (5 Volum konzentrierte auf 100 Volum) erst durch Dekantieren, dann auf dem Filter chlorfrei gewaschen, in der Wärme mit überschüssigem Bariumhydrat zerlegt, und das Filtrat durch Kohlensäure oder in der Wärme durch überschüssige Schwefelsäure vom Baryt befreit. Die abfiltrierte Flüssigkeit, welche keine oder nur noch wenig Harnsäure enthält, wird mit ammoniakalischer Silberlösung gefällt und der Niederschlag gewaschen.

Der Harn muss eiweissfrei sein, darf aber Albumose enthalten. — Ob nach diesem Verfahren auch diejenigen Basen gewonnen werden, welche mit Baryt schwer lösliche Verbindungen liefern, ist nicht untersucht. — Die Kynurensäure, welche bei der Verarbeitung von Hundeharn mit in den Phosphorwolframsäure-Niederschlag eingeht, fällt beim Ansäuern des barythaltigen Filtrats mit Schwefelsäure zugleich mit dem Bariumsulfat aus. Die Phosphorwolframsäure schlägt auch das Kreatinin nieder; wenn man dasselbe zugleich gewinnen will, so scheidet man es nach dem Entfernen des Baryts durch Chlorzink (und essigsäures Natron) ab.

### 4. Durch Titrieren mit Silbersalz.

Bartley wendet sein zur Bestimmung der Harnsäure vorgeschlagenes Verfahren auch auf die Bestimmung der Xanthinbasen an, indem er nach dem Er-

<sup>1)</sup> Stadthagen, Virchows Arch. 109. 406. 1887. — Baginsky, Zeitschr. f. physiol. Ch. 8. 396. 1883/84.

<sup>2)</sup> F. Hofmeister, Zeitschr. f. physiol. Ch. 5. 67. 1881.



kalten des bereits zum Titrieren der Harnsäure benutzten Harns noch von seiner ammoniakalischen Silberlösung wieder bis zum Eintritt der Endreaktion zusetzt. Es ist keine Bürgschaft für die Richtigkeit des Resultats vorhanden.

## Indirekte Verfahren.

### 1. Nach Haycraft<sup>1)</sup>.

A. Prinzip. Der Harn wird, wie bei dem Verfahren von Ludwig (S. 981) mit Magnesiamischung und ammoniakalischer Silberlösung gefällt, der Niederschlag auf einem eigens hergerichteten Filter gewaschen, in Salpetersäure gelöst und das in Lösung gegangene Silber nach Volhard titriert. Ausserdem wird in einem gleichen Volumen Harn die Harnsäure gesondert bestimmt. Auf die Harnsäure entfällt für ein Mol. derselben von dem gefundenen Silber 1 Atom oder auf 1 g Harnsäure 0,643 g Silber. Das für die Harnsäure berechnete Silber wird von der Summe des Silbers abgezogen und aus dem Rest die Menge der Xanthinbasen berechnet, welche auf 1 Mol. 2 Atome Silber enthalten haben; 1 g Silber entspricht danach 0,704 g Xanthin.

Eiweisshaltiger Harn muss so vollständig vom Eiweiss befreit werden, wie bei der quantitativen Bestimmung von Harnsäure (S. 1054). Gegenwart von Zucker beeinträchtigt nach Herrmann die Bestimmung nicht. Eine vorläufige Fällung des Harns mit Magnesiamischung ist hier nicht am Platze, weil hier ein voluminöser Niederschlag erwünscht ist. Ein Uratsediment kann man abfiltrieren, muss aber für die gesonderte Bestimmung der Harnsäure denselben filtrierten Harn benutzen.

Das Verfahren ist von Herrmann<sup>2)</sup> in einigen Punkten abgeändert worden.

### B. Erfordernisse.

1. Ammoniakalische Silberlösung,
2. Magnesiamischung, beide nach Ludwig.
3. Fünfzigstelnormal-Silberlösung (mit 3,4 g Silbernitrat im Liter).
4. Chlor- und salpetrigsäurefreie Salpetersäure von ungefähr 1,2 Dichte.
5. Fünfzigstelnormal-Rhodanlösung. Man löst ungefähr 2 g Rhodanammonium zum Liter und stellt die Lösung auf die Fünfzigstelnormal-Silberlösung.
6. Das Filter. Zur Herrichtung des Filters wird ein rundes, siebförmig durchlohtes Platinblech von 2 cm Durchmesser in einen Trichter gelegt, darauf eine ganz dünne Schicht Glaswolle und auf diese mit mässig verdünnter Salzsäure ausgekochte und wieder säurefrei gewaschene Asbestwolle. Diese wird mit den Fingern so an Trichterwand und Platinblech angedrückt, dass sich ein muldenförmiger fester Filz bildet. Die Glaswolle verhindert das Verstopfen der Löcher des Filterblechs durch den Asbest beim Absaugen mit der Pumpe. Auf dem Filter bleibt Harnsäure zurück und es kann daher nur zu einer einzigen Bestimmung gebraucht werden.

<sup>1)</sup> J. B. Haycraft, Brit. med. Journ., Dec. 12. 1885. 1100; Zeitschr. f. analyt. Ch. 25. 165. 1885.

<sup>2)</sup> A. Herrmann, Zeitschr. f. physiol. Ch. 12. 496. 1888.



### C. Ausführung nach Haycraft-Herrmann.

Man versetzt 50 ccm Harn mit je 5 ccm der Ludwigschen Silberlösung und Magnesiamischung, wie bei Ludwig (S. 1051), lässt den Niederschlag sich einigermassen absetzen und filtriert zuerst die Flüssigkeit durch das Filter (6) mit der Saugpumpe ab, dann verteilt man 4 g doppeltkohlensaures Natron in groben Stücken auf der Filterfläche und bringt den Niederschlag auf dasselbe. Der Zusatz von Bicarbonat hat wie die Erzeugung des Tripelphosphats den Zweck, den Niederschlag locker zu machen. Das Becherglas, in welchem der Niederschlag enthalten war, sowie dieser selbst werden mit schwach ammoniakalischem Wasser vollständig chlor- und silberfrei gewaschen, anfangs mit der Saugpumpe, bis der Niederschlag rissig wird, später ohne dieselbe, weil sonst Niederschlag in das Filtrat übergeht. Es kann die Pumpe dann nur zum Absaugen der letzten Tropfen Flüssigkeit aus dem Filter benutzt werden. Auf Silber prüft man das Filtrat mit Salzsäure, setzt aber nur wenig mehr zu, als zum Ansäuern des Filtrates erforderlich ist, weil eine schwache Chlorsilbertrübung in überschüssiger Salzsäure leicht wieder verschwindet; auf Chlor wird mit einer klaren Lösung von Silbernitrat in schwacher Salpetersäure geprüft.

Der rein gewaschene Niederschlag wird dann auf dem Filter durch Übergiessen mit der chlor- und salpetrigsäurefreien Salpetersäure (4) gelöst. Nachdem der Niederschlag in Lösung gegangen ist, wäscht man das Filter mittels der Saugpumpe erst mit stark verdünnter, gleichfalls reiner Salpetersäure und dann mit Wasser bis zum Verschwinden der sauren Reaktion. Die Zeit vom Filtrieren des Niederschlags bis zum Lösen desselben braucht  $\frac{1}{2}$  Stunde nicht zu überschreiten. Die Lösung des Niederschlags titriert man dann mit der Rhodanlösung (5) wie bei der Titerstellung auf dieselbe Endreaktion. Zwei solcher Bestimmungen mit demselben Harn können nach Herrmann bei richtiger Ausführung des Verfahrens identische Resultate geben.

### D. Ausführung nach Denigès.

Die Ausführung der Vorschrift von Haycraft erfordert grosse Geschicklichkeit und Genauigkeit und ist wegen der Herstellung des Filters umständlich. Czapek<sup>1)</sup> hat daher zuerst ein Verfahren angegeben, das von der Harnsäure und den Xanthinbasen gebundene Silber durch Zurücktiteren des Silbers zu bestimmen, welches nach Zusatz einer bekannten Menge in Ammoniak gelösten Silbers zu Harn in Lösung bleibt. Zum Titrieren des Silbers in ammoniakalischer Lösung diente Kalium- oder Natrium-Sulphydrat. Dieses ändert aber beim Auf-

<sup>1)</sup> Czapek, Zeitschr. f. physiol. Ch. 12. 502. 1888.

bewahren seinen Titer fortwährend und es muss bei jeder einzelnen Analyse sein Titer neu gestellt werden. Dadurch ist das Verfahren umständlich. An Stelle des Sulphydrats hat Denigès Cyankalium gesetzt und dadurch das Verfahren praktischer gestaltet.

Das Prinzip der Methode und die Erfordernisse sind S. 1047 angegeben und das Verfahren für die Titrierung von reiner Harnsäure beschrieben. Um die Bedingungen, unter denen die Titrierung des Harns vor sich gehen soll, denen der Titerstellung der Cyankaliumlösung möglichst gleich zu machen, misst man zu 100 ccm Harn 75 ccm der a. a. O. vorgeschriebenen Silber-Magnesiummischung, schüttelt um, filtriert und verwendet vom Filtrat  $\frac{4}{5}$  des ursprünglichen Volumens, d. i. 140 ccm, zur Titrierung. Es werden 20 ccm der Cyankaliumlösung zugemessen und so lange von der  $\frac{1}{50}$ -n-Silberlösung zufließen gelassen, bis bleibende Trübung eintritt. Die verbrauchte Menge Silber gibt an, wie viel Silber in dem Silberniederschlag des Harns enthalten ist. Da nur  $\frac{4}{5}$  des ursprünglichen Volumens titriert worden sind, so hat man die Anzahl der verbrauchten Kubikzentimeter mit  $\frac{5}{4}$  zu multiplizieren, um zu erfahren, wie viel von der Silberlösung für 100 ccm Harn nötig gewesen wäre.

Daneben ist in 100 ccm desselben Harns die Harnsäure für sich zu bestimmen. Für 0,1 g dieser Harnsäure zieht man 29,76 ccm von der verbrauchten Silberlösung ab; von dem Rest der Silberlösung entspricht der Kubikzentimeter 1,52 mg Xanthin.

Die Richtigkeit des Resultats hängt davon ab, mit welcher Genauigkeit die Summe von Harnsäure und Xanthinbasen und die Harnsäure für sich bestimmt werden können. Denigès hat 10 normale und pathologische Harne nach Haycraft und nach seinem Verfahren mit sehr guter Übereinstimmung der Resultate analysiert. Eiweiss stört nicht, nur die jodidhaltigen Harne sind vorher vom Jod in der Weise zu befreien, dass 100 ccm Harn in einem Masszylinder mit 1 ccm Salpetersäure und 20 ccm  $\frac{1}{10}$ -n-Silberlösung versetzt werden; diese Silbermenge bindet das Jod von 0,332 g Jodkalium, genügt also für alle Fälle. Man fügt dann noch 5 ccm gesättigte Kochsalzlösung zu, um etwa überschüssiges Silber zu entfernen, füllt auf 200 ccm auf und filtriert. Das Filtrat enthält ein halbes Volumen Harn.

## 2. Nach Camerer.

A. Prinzip. Camerer<sup>1)</sup> fällt den Harn mit Magnesiummischung aus, das Filtrat mit ammoniakalischer Silberlösung und bestimmt in dem Silberniederschlag den Stickstoff. Von dem gesamten Stickstoff wird der Stickstoff der gesondert bestimmten Harnsäure ( $=\frac{1}{3}$  des Gewichts der Harnsäure) abgezogen, der Rest ist der Basenstickstoff.

Erfordernisse und Ausführung s. S. 941 bei der Bestimmung des Gesamt-Purin-N nach Camerer-Arnstein.

<sup>1)</sup> W. Camerer, Zeitschr. f. Biol. 26. 104. 1890; 28. 72. 1891.

Neubauer-Huppert, Analyse des Harns. 11. Aufl.

### III. Darstellung, Trennung und Identifizierung der Purinbasen.

Wenn man von den nur exogenen Methylxanthinen absieht, so ist die Verteilung der Purinbasen im Menschenharn derart, dass am meisten Xanthin, weniger Hypoxanthin und am wenigsten Adenin ausgeschieden wird. Guanin scheint kaum vorzukommen. Wie sich die Verhältnisse bei purinfreier Ernährung gestalten, ist unbekannt, da eine der Krüger-Salomonson'sche analoge umfassende Untersuchung bei purinfreier Kost nicht vorliegt. Von den rein exogenen, weil körperfremden, Methylxanthinen wird wieder die höchste Abbaustufe in grösster Menge ausgeschieden und die übrigen in der ihrem Abbau entsprechenden Reihenfolge. Am meisten 1-Methylxanthin, dann 7-Methylxanthin und am geringsten 3-7-Methylxanthin.

Beabsichtigt man einigermaßen grössere Mengen der Basen darzustellen, so lohnt sich die Arbeit nur mit grossen Quantitäten Harn (einige 100 Liter).

Die vorläufige Trennung der Basen voneinander kann entweder in ihren Verbindungen mit Silbernitrat geschehen, wenn man nach der Abtrennung der Harnsäure von einer neuerlich erzeugten Fällung mit ammoniakalischer Silberlösung ausgeht, oder in den nach der Entfernung der Harnsäure verbleibenden salzsauren Mutterlaugen vorgenommen werden.

Zur Fällung der Basen verwendet man eines der Verfahren, welche oben (S. 940) zur quantitativen Bestimmung des Gesamt-Purin-N oder der Basen beschrieben wurden. 1. Mit ammoniakalischer Silberlösung, 2. mit Kupfersulfat und Bisulfit, 3. mit Phosphorwolframsäure. Die Fällung mit Phosphorwolframsäure ist aber zur Darstellung der Basen unmittelbar nicht geeignet, weil ausser den Basen noch mehrere andere Stoffe durch dieses Reagens aus dem Harn gefällt werden. Die durch Barythydrat in Freiheit gesetzten Basen müssen deshalb noch einmal und zwar am besten durch ammoniakalische Silberlösung niederschlagen werden.

Die Abtrennung der Harnsäure erfolgt nach dem Zerlegen der Niederschläge mit Schwefelwasserstoff oder Natriumsulfid durch Einengen mit Salzsäure und Filtrieren oder durch Zerlegen der Silberniederschläge mit verdünnter Salzsäure<sup>1)</sup>, bei letzterem Verfahren bleibt der grösste Teil der Harnsäure mit dem Chlorsilber auf dem Filter. Da die Harnsäure in verdünnter Salzsäure nicht ganz unlöslich ist, so ist die Basenfraktion immer mit etwas Harnsäure verunreinigt. Es sei denn,

<sup>1)</sup> Krüger, Zeitschr. f. physiol. Chem. 16. 162. 21. 175.



dass man nach Kossa (S. 1051) vorgeht oder die Harnsäure durch Braunstein oder Salpetersäure oxydiert.

### 1. Trennung der Basen in Verbindung mit salpetersaurem Silber.

Nach dem Abtrennen der Harnsäure werden die Mutterlaugen derselben mit Ammoniak wieder alkalisch gemacht und mit ammoniakalischer Silberlösung neuerlich gefällt. Der Niederschlag wird gut gewaschen und zunächst nach Neubauer in möglichst wenig heisser Salpetersäure von 1,1 Dichte gelöst. Man bringt den Niederschlag in einen Glaskolben, schüttet etwas Harnstoff hinzu, dann die Salpetersäure, erhitzt auf dem Sand- oder Wasserbade, bis die Flüssigkeit gelb geworden und möglichst vollständige Lösung des Niederschlages eingetreten ist und filtriert heiss (durch Glaswolle oder Asbest). Aus dem Filtrat scheiden sich innerhalb der ersten (zwölf) Stunden nach dem Filtrieren Guanin (dieses sehr bald), Hypoxanthin, Adenin und Epiguanin mit salpetersaurem Silber verbunden in mikroskopischen Krystalldrüsen aus (Hypoxanthinfraktion), während Xanthin und seine Homologen (Xanthinfraktion) zunächst in Lösung bleiben. Bei tagelangem Stehen kann auch ein grösserer oder geringerer Teil dieser als Verbindungen mit Silbernitrat ausfallen.

Damit man mit dem gallertigen Silberoxyd-Niederschlag nicht unnütz viel Wasser mit der Salpetersäure zusammenbringt, lässt man das Filter mit dem Niederschlag so lang auf Fliesspapier liegen, bis man den noch feuchten Niederschlag mit Leichtigkeit abnehmen kann; das Filter behandelt man für sich mit der Salpetersäure. — Beim Kochen mit der Salpetersäure wird der letzte Rest Harnsäure zerstört. — Harnstoff fügt man nach Kossel dem Silberniederschlag, der in der Salpetersäure gelöst werden soll, hinzu, um die sich bildende salpetrige Säure zu zersetzen, denn diese führt das Guanin in Xanthin, das Adenin in Hypoxanthin über; aber auch bei Zusatz grosser Mengen Harnstoff lässt sich die Zersetzung wenigstens des Adenins nicht ganz verhüten (Bruhns, Krüger<sup>1)</sup>). Es sollte daher erst dann die Lösung des Silberniederschlags in Salpetersäure vorgenommen werden, wenn er von Farbstoff und anderen oxydablen Substanzen möglichst befreit ist, was durch wiederholtes Lösen und Füllen anzustreben ist. Etwa noch vorhandenes Chlorsilber bleibt beim Kochen mit der Salpetersäure als schweres Pulver zurück. Da sich das Guaninsilber nur sehr schwer in der verdünnten Salpetersäure löst, so kann auch von ihm ein Teil zurückbleiben. Statt dass man sogleich alles in einem Überschuss von Salpetersäure zu lösen versucht, tut man besser, die mit einer kleinen Menge Säure erhaltene Lösung zunächst abzufiltrieren und eine Probe des Rückstands auf seine Löslichkeit in Ammoniak zu prüfen. Tritt keine vollständige Lösung ein, besteht der Rückstand also nicht bloss aus Chlorsilber, so kocht man ihn mit einer neuen Menge der verdünnten Salpetersäure aus, oder zieht die Basis durch Digestion aus dem gewaschenen Rückstand mit verdünnter Salzsäure aus. — Das Filtrieren der heissen Lösung in Salpetersäure ist überflüssig; wenn man sich überzeugt hat, dass beim Kochen

<sup>1)</sup> Bruhns, Zeitschr. f. physiol. Ch. 14. 534. — Krüger, daselbst 21. 282.



alles, was sich überhaupt in der Salpetersäure lösen kann, gelöst hat, lässt man die Flüssigkeit die vorgeschriebene Zeit stehen. Dieses Verfahren hat den Vorteil, dass so schwer lösliche Verbindungen, wie die des Guanins, dem Nachweis weniger leicht entgehen.

Eine scharfe Trennung der Xanthinbasen in die genannten zwei Gruppen ist auf diese Weise nicht zu erreichen. Es hängt wesentlich von der zum Lösen verwendeten Salpetersäure ab, ob im Filtrat Xanthin und seine Homologen (als Verbindungen mit Silbernitrat) mit auskrystallisieren und ob wenigstens Hypoxanthin teilweise in Lösung bleibt. Durch (einmaliges) Umkrystallisieren der Hypoxanthinfraktion aus Salpetersäure von 1,1 Dichte kann man den in ihr eingeschlossenen Anteil der Xanthinfraktion in Lösung bringen.

Man filtriert den beim Erkalten entstandenen Niederschlag ab und wäscht ihn zunächst mit der verdünnten Salpetersäure etwas nach. Beim Waschen des Niederschlages mit Wasser ist eine Zerlegung in seine Bestandteile und Zurückbleiben von Xanthin im Niederschlag möglich. Filtrat (samt Waschflüssigkeit) sowie Niederschlag werden gesondert weiter verarbeitet.

a) Verarbeitung der Lösung (Xanthinfraktion).

α) Das Filtrat wird nach Salomon<sup>1)</sup> mit Ammoniak übersättigt, der Niederschlag durch Dekantieren oder auf dem Filter gewaschen und mit Schwefelwasserstoff zerlegt. Man filtriert heiss, dampft auf ein kleines Volumen ein und lässt nach Zusatz von etwas Ammoniak 12 bis 24 Stunden stehen, wobei die letzten Spuren von Phosphaten, von Harnsäure und von Oxalat ausfallen. Das Filtrat wird nun weiter in einem Becherglas bis zum Eintritt einer diffusen Trübung eingeeengt. Beim Erkalten scheidet sich das meiste Xanthin und Heteroxanthin ab, während das Paraxanthin mit dem übrigen Xanthin (und Heteroxanthin) in Lösung bleibt. Man filtriert und konzentriert weiter, so lange noch ein amorpher Niederschlag (von Xanthin) erfolgt, der entfernt werden muss. Zuletzt krystallisiert das Paraxanthin in den beschriebenen Formen aus. Die Krystalle werden abgepresst und aus heissem Wasser umkrystallisiert.

Es geschieht sehr oft, dass das Schwefelsilber mit durch das Filter geht; in solchem Falle verdampft man bis zur Trockne, zieht den Rückstand mit heissem Wasser aus und wiederholt das Verfahren so oft, bis die Lösung nicht mehr von Schwefelsilber getrübt ist. Wenn die Lösung sehr unrein ist, so kann die Krystallisation beim Eindampfen ausbleiben. In solchem Falle lässt man die Lösung bei Zimmertemperatur eintrocknen und erhält so manchmal sehr schöne Krystalle. Geschieht dies nicht, so löst man in viel Wasser, fällt mit stark verdünnter ammoniakalischer Silberlösung, wäscht den Niederschlag gut aus und verfährt wie vorher.

Dem Paraxanthin kann noch Heteroxanthin beigemischt sein. Um zu erfahren, ob dies der Fall ist, und um beide Basen zu trennen, löst

<sup>1)</sup> Salomon, Berichte d. chem. Gesellsch. 16. 195; 18. 3407; Zeitschr. f. klin. Med. a. a. O.

man die Krystalle unter Zusatz von etwas Natronlauge in wenig heissem Wasser und lässt erkalten. Die sich dabei absetzenden Krystalle werden abgepresst, in Wasser gelöst und die Lösung mit Salzsäure neutralisiert; das Paraxanthin scheidet sich dabei in der ursprünglichen Krystallform, das Heteroxanthin amorph ab. Man löst den gewaschenen Niederschlag in wenig Salzsäure, wonach in etwa 48 Stunden das salzsaure Heteroxanthin in grossen farblosen Büscheln anschießt, während das sehr leicht lösliche salzsaure Paraxanthin in der Mutterlauge bleibt. Diese wird mit Ammoniak eingedampft, der Rückstand ausgewaschen, in Ammoniak gelöst und die Lösung langsam eingengt.

Um das Heteroxanthin, welches mit dem Xanthin beim Eindampfen zuerst ausgefallen ist, von diesem zu trennen, löst man alles in ziemlich viel ammoniakhaltigem Wasser und dampft, wenn nötig öfter, sehr mässig ein, bis sich nach 24stündigem Stehen in der Kälte blättrige Krusten am Boden des Becherglases vorfinden. Sie kennzeichnen sich als Heteroxanthin dadurch, dass sie mit Natronlauge eine krystallinische Verbindung geben. Ist Heteroxanthin vorhanden, so wird die abgegossene Mutterlauge immer weiter eingedampft, bis die ausgeschiedenen Massen mit Natronlauge kaum noch einen Niederschlag geben. Man löst dann die gesamte Substanz in wenig heisser Natronlauge, presst nach 24 Stunden die ausgefallenen grossen Krystallbüschel ab, löst sie in Wasser und neutralisiert die Lösung mit Salzsäure, wobei das Heteroxanthin als amorphes Pulver ausfällt. Man wäscht den Niederschlag aus, löst ihn in Salzsäure und verfäht, wie oben für die Trennung des Heteroxanthins vom Paraxanthin angegeben ist.

Selbstverständlich braucht man die ursprüngliche ammoniakalische Lösung nicht bis zur gemeinsamen Ausscheidung des Xanthins und Heteroxanthins einzudampfen, sondern man kann auch sogleich zuerst das Heteroxanthin für sich auskrystallisieren lassen.

Als Balke <sup>1)</sup> das Bleisalz des rohen, aber anscheinend von seinen Homologen befreiten Xanthins mit Schwefelwasserstoff zersetzt hatte, schied sich aus dem stark verdünnten ammoniakalischen Filtrat beim Stehen Heteroxanthin in gleichseitigen sphärischen Dreiecken ab.

Das meist stark gefärbte Xanthin lässt sich nach Balke von dem hartnäckig haftenden Farbstoff leicht befreien, wenn man es in möglichst wenig Natronlauge löst, nur so lange Kohlensäure einleitet, dass sich die Nadelchen des Xanthin-Natrons abscheiden, und nun die ziemlich leicht lösliche Verbindung einige Male aus heissem Wasser umkrystallisiert. Essigsäure scheidet das Xanthin zuletzt in schneeweissen Flocken ab. Das Xanthin selbst erhält man aus diesem Präparat nach dem Verfahren von Horbaczewski <sup>2)</sup> krystallisiert.

<sup>1)</sup> Balke, Journ. f. prakt. Ch. [2] 47. 545.

<sup>2)</sup> Balke, a. a. O. 558. — J. Horbaczewski, Zeitschr. f. physiol. Ch. 23. 226. 1897.

Dazu löst man das Xanthin in wenig Lauge, filtriert wenn nötig, verdünnt die Lösung mit 60° warmem Wasser so, dass 1 g Xanthin in 2 Liter gelöst ist, und übersättigt mit Essigsäure. Trübt sich dabei die Lösung sogleich, so muss sie schnell durch ein Faltenfilter filtriert werden. Bei mehrtägigem Stehen der Lösung in Zimmertemperatur krystallisiert das Xanthin in Drusen rhombischer Plättchen an der Wand und am Boden des Gefässes aus. Sie werden auf einem Filter nacheinander mit Wasser, Alkohol, Äther gewaschen. Weniger vorteilhaft ist ein anderes Verfahren, bei welchem eine alkalische Lösung von 1 g Xanthin in 700–750 ccm heissem Wasser mit  $\frac{1}{3}$  Volum Alkohol vermischt und mit Essigsäure übersättigt wird; hier erfolgt die Krystallisation langsamer.

Nachdem aus der Xanthinfraktion das Heteroxanthin mittels seiner schwer löslichen Natriumverbindung abgeschieden war, verfuhrn Krüger und Salomon<sup>1)</sup> zur weiteren Aufarbeitung dieser Fraktion so, dass die in Lösung gebliebenen Basen aus der heissen Mutterlauge durch Neutralisieren mit Salzsäure und der Rest durch ammoniakalische Silberlösung niedergeschlagen wurde. Beide Niederschläge wurden in Salpetersäure von 1,1 Dichte gelöst und mit 10% Silbernitrat gefällt. Der dabei entstandene Niederschlag enthielt Xanthin und 1-Methylxanthin. Das Filtrat schied nach dem Fällern mit Ammoniak und dem Zerlegen des Niederschlags mit Schwefelwasserstoff beim Konzentrieren der Lösung noch Heteroxanthin mit etwas Xanthin ab, in Lösung blieb Paraxanthin. Die beiden Basen wurden an hren Natriumsalzen erkannt.

β) Für die Darstellung und den Nachweis des Xanthins und seiner Homologen im kleinen (aus einigen Liter Harn) gibt Salomon<sup>2)</sup> noch folgende Vorschrift.

Nach der Zerlegung des ersten Silberniederschlags mit Schwefelwasserstoff wird das Filtrat zur Trockne verdunstet und der Rückstand nach Salkowski<sup>3)</sup> mit 30fach verdünnter Schwefelsäure erwärmt, welche die Xanthinbasen aufnimmt und die Harnsäure fast ganz zurücklässt. Die heiss filtrierte Lösung wird mit Ammoniak übersättigt, nach dem Erkalten wieder filtriert und mit ammoniakalischer Silberlösung gefällt, der Niederschlag schwefelsäurefrei gewaschen, in heisser Salpetersäure von 1,1 Dichte gelöst und die Xanthinfraktion nach III. 1. a. α) S. 990 weiter behandelt. Die Lösung der Xanthinbasen wird eingedampft.

Sind im Rückstand Krystalle, Körner oder Knollen vorhanden, so nimmt man sie, wenn nötig unter Verflüssigung des Rückstandes durch Anwärmen, heraus und versucht sie aus warmem Wasser umzukrystallisieren. Es sind zwei Fälle möglich; entweder scheiden sich Krystalle und Krystallaggregate aus, oder amorphe und knollige Massen. Das Auftreten von Krystallen in den typischen Formen des Paraxanthins beweist allein schon die Gegenwart dieser Basis; bestätigt wird sie dadurch, dass ein Krystall oder Korn sich nach dem Befeuchten mit Wasser in starker Natronlauge mit einem Krystallrasen überzieht.

Die amorphen Knollen können aus Paraxanthin, Heteroxanthin oder Xanthin bestehen. Man behandelt einen kleinen Teil der knolligen Masse mit Natronlauge und befreit die Krystalle, wenn sich solche ausscheiden, auf einer porösen Platte von der überschüssigen Lauge. Scheiden sich beim Eintragen der Krystalle in eine Ammonsalzlösung Tafeln oder Büschel grosser Nadeln aus, so ist Paraxanthin nachgewiesen, fallen dagegen amorphe Massen aus, die allmählich Knollenform an-

<sup>1)</sup> Zeitschr. f. phys. Ch. 24.

<sup>2)</sup> Salomon, Virchows Arch. 125. 562. 1891.

<sup>3)</sup> Salkowski, Virchows Arch. 50. 193. 1870.



nehmen, so ist die Anwesenheit von Heteroxanthin wahrscheinlich. Um sich hierüber Gewissheit zu verschaffen, kocht man das ganze verfügbare Material mit wenig Wasser aus, löst den grösseren Teil des ungelösten in verdünnter Natronlauge und lässt langsam verdunsten. Das Auftreten von doppelbrechenden Zwillingsskristallen beweist die Gegenwart von Heteroxanthin. Lösen sich die Körner leicht und schnell in wenig Natronlauge, so ist wahrscheinlich Xanthin vorhanden, worüber die Xanthinprobe Aufschluss verschafft.

Finden sich im Abdampfungsrückstand keine Körner vor, so spült man die vorher getrocknete Masse zur Entfernung der Ammonsalze mit Wasser ab, löst in wenig Natronlauge, lässt langsam verdunsten und untersucht weiter wie vorher.

γ) Trennung des Xanthins von der Harnsäure. Obwohl sich das Xanthin in Salzsäure löst, die Harnsäure aber nicht oder doch nur wenig, so lässt sich eine scharfe Trennung beider Körper doch nicht mittels Salzsäure bewirken, weil die Löslichkeit des Xanthins in Salzsäure eine zu geringe ist und sich das Xanthin aus der Lösung leicht wieder abscheidet (Wulff). Die Unzulänglichkeit eines solchen Verfahrens ist von Horbaczewski<sup>1)</sup> durch quantitative Versuche erwiesen worden. Auch die Löslichkeit des Xanthins in Ammoniak und die Schwerlöslichkeit des sauren Ammonurats lässt sich für diesen Zweck nicht verwenden, da nach Horbaczewski aus einer Lösung von Harnsäure und Xanthin in wenig Natronlauge die Harnsäure auf Zusatz von Salmiak bei weitem nicht vollständig ausfällt.

Wenn es darauf ankommt, das Xanthin vollständig von beigemengter Harnsäure zu trennen, so kann man sich einer der folgenden Methoden bedienen.

γ a) Verfahren von Wulff<sup>2)</sup>. Man versetzt das Gemenge auf 0,1 g Trockensubstanz mit 10 ccm einer Salpetersäure, welche durch Verdünnen von 5 Teilen Salpetersäure von 1,4 Dichte auf 100 hergestellt ist, erwärmt unter Umschütteln im Wasserbad bis zur Beendigung der Gasentwicklung und kocht kurze Zeit auf. Bei Anwesenheit von viel Xanthin kann ein Teil desselben ungelöst bleiben. Man versetzt darauf die Flüssigkeit in geringem Überschuss mit (reinem) Ammoniak. Eine dabei zuweilen auftretende, von Oxydationsprodukten der Harnsäure herührende Rotfärbung verschwindet beim Erwärmen auf Zusatz von noch etwas Ammoniak (die von rohem Ammoniak verursachte nicht). Fügt man dann schwach ammoniakalische Silberlösung hinzu, so entsteht bei Gegenwart von Xanthin ein voluminöser flockiger Niederschlag von Xanthinsilber. Tritt dieser Niederschlag auch nach einiger Zeit nicht ein, so können immer noch geringe Mengen Xanthin in der ammoniakalischen Flüssigkeit gelöst enthalten sein. Man stumpft dann das Ammoniak, selbst bis zur neutralen Reaktion, mit Salpetersäure ab, von etwa ausfallenden geringen Mengen Chlorsilber, das sich fest am Boden absetzt, lässt sich dann immer noch das flockige Xanthinsilber unterscheiden. Es lassen sich so noch 5 mg Xanthin neben 1 g Harnsäure nachweisen.

Das Verfahren ist, abgesehen von geringen Verlusten, quantitativ genau und eignet sich für die Bestimmung des Xanthins. Kleine Mengen werden (nach dem Auswaschen und Trocknen bei 120°) als Xanthinsilber gewogen oder aus dem beim Glühen zurückbleibenden metallischen Silber berechnet. Grössere Mengen bestimmt man direkt, indem man nach der Oxydation die Flüssigkeit mit Ammoniak

<sup>1)</sup> J. Horbaczewski, Zeitschr. f. physiol. Ch. 18. 343. 1893.

<sup>2)</sup> C. Wulff, Zeitschr. f. physiol. Ch. 17. 640. 1893.



schwach alkalisch macht, auf dem Wasserbad kurze Zeit erwärmt, mit Essigsäure ansäuert und das gleiche Volumen Alkohol hinzusetzt. Nach 12 Stunden wird das Xanthinsilber abfiltriert, mit alkoholhaltigem Wasser gewaschen und bei 110° getrocknet.

Das Verfahren wird genau nach der Vorschrift zu befolgen sein. Salkowski<sup>1)</sup> nahm bei der Behandlung der (gesamten) Xanthinbasen aus Harn mit Salpetersäure wahr, dass um so weniger von ihnen erhalten wurde, unter Umständen fast nichts, je mehr Salpetersäure verwendet wurde und je länger das Erhitzen dauerte.

Bei diesem Verfahren wird die Harnsäure zerstört. Eine Scheidung unter Erhaltung der Harnsäure lässt sich durch Schwefelsäure erreichen.

$\gamma \beta$ ) Nach Salkowski<sup>2)</sup> wird die trockene Substanz mit 2–3%iger Schwefelsäure erwärmt, am nächsten Tag filtriert, mit Ammoniak übersättigt, von etwa ausfallendem Ammonurat abfiltriert und nun mit ammoniakalischer Silberlösung gefällt. Dieses Verfahren ist unsicher. Dagegen gibt das folgende gute Resultate.

$\gamma \gamma$ ) Nach Horbaczewski<sup>3)</sup> wird das Gemenge bei 110° getrocknet, auf 0,1 g in einem Platinschälchen mit 2 ccm reiner Schwefelsäure übergossen und unter gelindem Erwärmen gelöst. Der Lösung fügt man die vierfache Menge Wasser zu, rührt fleissig bis zur beginnenden Abscheidung der Harnsäure, filtriert nach 3–6 Stunden durch ein ganz kleines Filter und wäscht erst mit schwefelsäurehaltigem Wasser, dann mit reinem. Zur Entfernung einer Spur anhaftenden Xanthins löst man die Harnsäure in dem Platinschälchen in Natronlauge e natrio, säuert mit Salzsäure an, dampft auf einige Kubikzentimeter ein und kann dann die Harnsäure nach 1 Stunde abfiltrieren. Die geringe Menge Harnsäure, welche sich neben dem Xanthin noch in Lösung befindet, lässt sich (nach  $\gamma \alpha$ ) mit Salpetersäure zerstören. Quantitativ wird die Harnsäure aus der schwefelsauren Lösung durch Alkohol gefällt (Kossa S. 1065), ob hiebei jedoch die Purinbasen gelöst bleiben und nicht z. T. auch ausfallen, ist nicht untersucht.

Auch dieses Verfahren ist zur quantitativen Bestimmung des Xanthins und ausserdem der Harnsäure tauglich. Die Harnsäure wird dazu auf einem Glaswollfilter mit sehr verdünnter Salzsäure, mit Wasser, Alkohol, Äther gewaschen und bei 110° getrocknet. Man findet ungefähr 3 % zu wenig.

$\gamma \delta$ ) Man verfährt nach Krüger und Schmid, indem man die Harnsäure durch Braunstein oxydiert (S. 983).

## b) Untersuchung der Hypoxanthinfraktion.

Für diese gibt es keine so erschöpfende Vorschrift, wie für die Untersuchung der Xanthinfraktion. Es liegen einzelne gelegentliche Beobachtungen vor und sind Versuche zur Trennung immer nur einiger der Basen dieser Fraktion, aber begreiflicherweise nicht aller auf einmal nebeneinander angestellt worden.

Der Niederschlag kann zur Entfernung etwa noch beigemengter Reste der Xanthinfraktion noch einmal aus Salpetersäure von 1,1 Dichte umkrystallisiert werden, unter Zusatz von Silbernitrat, weil sich das Hypoxanthin-Silbernitrat dann viel schwerer löst, als in reiner Salpetersäure.

Die Zersetzung kann nach dem älteren Verfahren in der Weise vorgenommen werden, dass man den Niederschlag zuerst zur Überführung der Verbindungen  $X \cdot AgNO_3$  in solche von  $X \cdot Ag_2O$  unter Zusatz von Silbernitrat mit Ammoniak

<sup>1)</sup> Salkowski, Zentralbl. f. d. med. Wissensch. 1894. 515.

<sup>2)</sup> Salkowski, Virchows Arch. 50. 193 u. a. a. O.

<sup>3)</sup> Horbaczewski, a. a. O. 344.

digiert, das Umwandlungsprodukt silberfrei wäscht und dann mit Schwefelwasserstoff behandelt, wobei die schwer löslichen Basen wenigstens zum Teil bei dem Schwefelsilber zurückbleiben können und diesem durch Lösungsmittel entzogen werden müssen. Schindler<sup>1)</sup> zerlegt den Niederschlag mit Schwefelammon, um das Schwefelsilber in abfiltrierbarem Zustand zu erhalten, in der Weise, dass er dem in heissem Wasser suspendierten Niederschlag tropfenweise, unter Vermeidung eines zu grossen Überschusses, eine schwache Schwefelammonlösung (aus 4 %igem Ammoniak) hinzufügt und das Schwefelsilber sich in der Wärme absetzen lässt. Auch so braucht nicht alles Guanin in Lösung zu gehen. Noch besser wäre in dieser Hinsicht die Behandlung des Niederschlags mit Schwefelnatrium.

Man kann auch, wie Kossel, die Silbernitratverbindung sogleich mit Schwefelwasserstoff behandeln, was den Vorteil darbietet, dass die frei werdende Salpetersäure die Basen in Lösung bringt. Bruhns<sup>2)</sup> empfiehlt, den Niederschlag durch Salzsäure zu zersetzen, was bei gehöriger Verdünnung sehr wohl geschehen könne, ohne dass man Gefahr laufe, Guanin in Xanthin und Adenin in Hypoxanthin umzuwandeln; nur lassen sich nach ihm die Basen dem klumpig gewordenen Chlorsilber durch Auskochen mit Säure nur schwer vollständig entziehen. Diese zwei letzteren Methoden verdienen den Vorzug, weil sie einfacher und zweckmässiger sind als das ältere Verfahren.

Hat man bei der Zersetzung des Silberniederschlags eine saure Lösung erhalten, so übersättigt man diese schwach mit Ammoniak, wobei Guanin und Epiguanin ausfallen können. Beim Verdunsten der übrigen ammoniakalischen Lösung scheiden sich dann ab das Adenin und Hypoxanthin; diejenige Basis zuerst, welche zuerst die Flüssigkeit sättigt. Man kann diese Basen in Chloride oder Sulfate verwandeln und durch fraktionierte Krystallisation zu trennen versuchen. Besser wird man aber durch Benutzung anderer ihrer Eigenschaften als durch die verschiedene Löslichkeit ihrer Salze zum Ziele gelangen.

Guanin. Von etwa beigemengter Harnsäure lässt sich das Guanin nach Horbaczewski<sup>3)</sup> sehr genau befreien mittels desselben Verfahrens (S. 994) wie das Xanthin. — Vom Epiguanin lässt es sich trennen durch heisses Wasser, schneller aber weniger vollkommen durch verdünntes Ammoniak, wobei das Epiguanin in Lösung geht und dann wieder auskrystallisiert. Beide Basen unterscheiden sich schon dadurch, dass das Guanin dabei amorph, das Epiguanin krystallinisch gewonnen wird. Das krystallisierte Guanin besitzt ganz andere Formen als das Epiguanin. Das Guanin ist ausserdem charakterisiert durch das makroskopische Chlorid (und das Sulfat), das Epiguanin nach Krüger durch das Chloroplatinat. Die Pikrate beider Basen besitzen verschiedene Gestalt, beide Basen geben die Xanthinreaktion, aber nicht die Weidelsche Probe. — Vom Adenin ist das Guanin verschieden durch die krystallinische Beschaffenheit des Adenins, die grössere Löslichkeit dieses in Ammoniak und dadurch, dass es mit Goldchlorid kein Chloraurat liefert, wie das Adenin. Die Pikrate

<sup>1)</sup> S. Schindler, Zeitschr. f. physiol. Ch. **13**. 433. 1889.

<sup>2)</sup> Kossel, daselbst **10**. 251. — Bruhns, daselbst **14**. 551 u. 560.

<sup>3)</sup> Horbaczewski, daselbst **18**. 348.

beider sind schwer löslich. Eine Trennung beider ist nach Wulff<sup>1)</sup> möglich, wenn man die stark saure Lösung mit Metaphosphorsäure versetzt, oder wenn man mit überschüssiger Metaphosphorsäure fällt; unter diesen Umständen scheidet sich das Guanin als Metaphosphat ab, das Adenin dagegen nicht. Das Guanin gibt die Xanthinprobe, das Adenin nicht. — Vom Hypoxanthin lässt sich das Guanin nicht mittels Pikrinsäure trennen, weil beide Pikrate schwer löslich sind und beide langsam ausfallen, wohl aber durch Metaphosphorsäure; das Guanin wird niedergeschlagen, das Hypoxanthin nicht. Aus dem Filtrat lässt sich das Hypoxanthin als Silberpikrat abscheiden, oder besser mit ammoniakalischer Silberlösung (Wulff).

**Adenin.** Die wasserhaltigen Krystalle des Adenins trüben sich bei 53°. Vom Hypoxanthin, welches amorph ist, lässt es sich als Pikrat trennen, auch in der Verbindung beider. Das Hypoxanthinpikrat ist zwar auch schwer löslich, scheidet sich aber langsamer aus. Das Adenin fällt nach Bruhns aus neutraler oder schwach saurer Lösung namentlich in Gegenwart von Natriumpikrat vollständig aus; man versetzt zur Fällung entweder die wässrige Lösung beider Basen mit wässriger Pikrinsäurelösung, oder besser die salzsaure Lösung mit einem Überschuss von Natriumpikrat (s. o. S. 936). Es ist aber nach Wulff nur dann Aussicht auf ein Gelingen der Trennung, wenn der Gehalt der Lösung nur gering (die Lösung verdünnt) ist, und wenn man nach der Fällung sogleich filtriert. Aus dem Filtrat lässt sich nach Bruhns das Hypoxanthin durch ammoniakalische Silberlösung gewinnen, oder aus der ganz neutralen pikrinsäurehaltigen Lösung durch Silbernitrat. Das Adenin wird zwar in der Kälte von Kupfersulfat und Thiosulfat als Kupferoxydulverbindung niedergeschlagen, das Hypoxanthin nicht, gleichwohl lassen sich die Basen auf Grund dieses Verhaltens nicht trennen; denn aus einer Lösung beider freien Basen nebeneinander fällt nach Krüger<sup>2)</sup> mit dem Adenin auch ein Teil des Hypoxanthins aus und lässt man das Reagens auf Salze der Basen einwirken, so ist die Fällung des Adenins nicht vollständig. Das Adenin gibt ein gut krystallisierendes Chloraurat, das Hypoxanthin nicht; die Platinsalze beider sind dagegen krystallinisch. Beide Basen geben weder die Xanthinprobe noch die Weidelsche Reaktion, aber bei beiden tritt Braunfärbung ein, wenn ihre Lösung nach dem Behandeln mit Zink und Salzsäure alkalisch gemacht wird.

Krüger und Salomon teilten die Hypoxanthinfraktion folgendermassen auf.

<sup>1)</sup> Wulff, Zeitschr. f. physiol. Ch. 17. 504.

<sup>2)</sup> Bruhns, daselbst 14. 538. — Wulff, daselbst 19. 499. — Bruhns, a. a. O. 557. — Krüger, Zeitschr. f. physiol. Ch. 20. 375.



Die Hypoxanthinfraktion wurde in die Verbindung mit Silberoxyd übergeführt, diese nach dem Wegwaschen der Salpetersäure mit Salzsäure zersetzt, die Lösung nach dem Neutralisieren mit Natronlauge der Reihe nach mit Bleiessig, mit Bleiacetat und Ammoniak und mit ammoniakalischer Silberlösung ausgefällt. Der mit Bleiessig entstandene Niederschlag enthielt Xanthin und 1-Methylxanthin, der mit Bleiacetat und Ammoniak 1-Methylxanthin, Hypoxanthin und wenig Adenin, der Silberniederschlag Epiguanin und Adenin. Adenin und Epiguanin sind also durch die Bleisalze nicht gefällt worden. In den Bleiessigniederschlag waren Xanthin und 1-Methylxanthin übergegangen, wiewohl diese Basen in reinem Zustand durch das Reagens nicht gefällt werden; sie wurden nicht getrennt. Aus der Lösung des vom Blei befreiten, mit ammoniakalischem Bleiacetat gewonnenen Niederschlags krystallisierte das 1-Methylxanthin direkt aus; die Mutterlauge wurde mit Salzsäure eingedampft, der Rückstand auf dem Wasserbad so lange erwärmt, bis keine Salzsäuredämpfe mehr entwichen und mit wenig kaltem Wasser digeriert; das 1-Methylxanthin blieb als solches ungelöst zurück, in Lösung gingen als salzsaure Salze das Adenin und das Hypoxanthin. Das Adenin wurde mit Pikrinsäure ausgefällt, das Hypoxanthin nach Entfernung der Pikrinsäure durch Schütteln mit Schwefelsäure und Benzol erst in die Verbindung mit Silberoxyd und dann in das charakteristische Nitrat und Pikrat übergeführt und als Chlorid analysiert. Der das Epiguanin und die Hauptmenge des Adenins enthaltende Silberniederschlag wurde mit Schwefelwasserstoff zerlegt. Aus der Lösung krystallisierte das Epiguanin schon beim Einengen aus. Das Filtrat enthielt das Adenin, wie sich aus seiner Fällbarkeit durch Kupfersulfat und Thiosulfat und der Untersuchung des Pikrats, Chloraurats und Sulfats ergab.

## 2. Trennung der Basen in den salzsauren Mutterlaugen der Harnsäure. (Krüger und Salomon<sup>1)</sup>).

Eine Behandlung der Mutterlaugen mit Tierkohle ist unzweckmässig (s. Adenin S. 950). Sie werden nach dem Abtrennen der Harnsäure bei möglichst niedriger Temperatur auf dem Wasserbade (Überleiten eines Luftstromes, Faustsches Wasserbad) eingedampft und die Salzsäure durch mehrmaliges Eindampfen mit Alkohol entfernt.

Der durch den Alkohol pulvrig gewordene Rückstand wird mit Wasser bei 40° digeriert, nach mehrstündigem Stehen in der Kälte abfiltriert und mit Wasser salzsäurefrei gewaschen. Man wäscht ihn darauf

<sup>1)</sup> Zeitschr. f. ph. Ch. 24.



noch mit Alkohol und mit Äther. Das Filtrat wird noch einmal eingedampft und in derselben Weise behandelt, wobei nur ein geringer, in Wasser unlöslicher Rückstand bleibt, der mit dem ersten vereinigt wird. Der Rückstand besteht aus Xanthin, Heteroxanthin und 1-Methylxanthin, während das Paraxanthin, von den Gliedern der Xanthingruppe das am leichtesten lösliche, mit den salzsauren Salzen der übrigen Basen in Lösung bleibt.

Um die drei Basen zu trennen löst man sie in der 15 fachen Menge warmer 3,3%iger Natronlauge, beim Erkalten fällt das Natriumsalz des Heteroxanthins vollständig aus. Nach 24stündigem Stehen filtriert man, rührt dann je 60 ccm des Filtrats nach dem Erwärmen auf 60° in ein kaltes Gemisch von 20 ccm Wasser und 20 ccm ausgekochter konzentrierter Salpetersäure allmählich ein und lässt mehrere Stunden bei niedriger Temperatur stehen, wobei sich das Xanthinnitrat vollständig abscheidet. Von noch etwas beigemengtem 1-Methylxanthin befreit man den Niederschlag in der Weise, dass man ihn mit Wasser übergiesst, in der Kälte neutralisiert, heiss in möglichst wenig Natronlauge löst und die 60° warme Lösung wieder, wie vorher, in die halbverdünnte Salpetersäure giesst; die Mengenverhältnisse wählt man so, dass 3 g des rohen Nitrats wieder auf 100 ccm Flüssigkeit mit 20 ccm konzentrierter Salpetersäure kommen. Das Xanthinnitrat ist rein, sobald es sich als schweres Krystallpulver in den charakteristischen Formen absetzt. Um aus dem Nitrat das freie Xanthin darzustellen, wird das Salz in Ammoniak gelöst und das überschüssige Ammoniak verjagt; es scheidet sich dabei völlig rein und schneeweiss ab. Das 1-Methylxanthin wird aus der vom Xanthinnitrat abfiltrierten Flüssigkeit durch Neutralisieren mit Natriumcarbonat gefällt, der dabei in Lösung bleibende Rest durch ammoniakalische Silberlösung, oder bequemer, nach dem Neutralisieren, durch Kupfersulfat und Natriumbisulfat.

Aus der salzsauren Lösung der übrigen Basen scheidet sich das Epiguanin schon bei schwachem Übersättigen derselben mit Ammoniak sofort in kleinen glänzenden Prismen ab. Das Filtrat wird durch Erwärmen vom Ammoniak befreit und die neutrale, nicht zu konzentrierte Lösung in der Kälte mit 1,1%iger Pikrinsäurelösung vollständig ausgefällt, der aus Adeninpikrat bestehende Niederschlag sofort abfiltriert und mehrmals mit kaltem Wasser gewaschen. Ein grosser Überschuss von Pikrinsäure ist zu vermeiden. Aus dem Pikrat gewinnt man das freie Adenin in der Weise, dass man das Salz in heisser verdünnter Salzsäure löst und der noch heissen Lösung die Pikrinsäure durch Schütteln mit Toluol entzieht. Das Filtrat vom pikrinsauren Adenin wird mit Schwefelsäure abgesäuert

und die Lösung durch Toluol oder Benzol in der Kälte von der Pikrinsäure befreit. Das Ausschütteln der Pikrinsäure kann man nach Jones<sup>1)</sup> sehr erleichtern bzw. vermeiden, wenn man das Adeninpikrat in Ammoniak löst und mit ammoniakalischer Silberlösung fällt, die Fällung mit Salzsäure zerlegt und nun erst den geringen Pikrinsäurerest durch Ausschütteln mit Benzol entfernt; ebenso kann man nach Jones mit den pikrinsäurehaltigen Mutterlaugen des Adenins verfahren. Die noch in Lösung befindlichen Basen werden durch ammoniakalische Silberlösung oder durch Kupfersulfat und Bisulfit gefällt, der Niederschlag salzsäurefrei gewaschen, mit Schwefelwasserstoff zerlegt und das Filtrat verdunstet. Vom trockenen Rückstand löst man je 3 g in 100 ccm auf das 10 fache Volumen verdünnter, konzentrierter Salpetersäure in der Wärme; beim Erkalten krystallisiert reines Hypoxanthinnitrat aus.

Das Filtrat vom Hypoxanthinnitrat enthält nur noch geringe Mengen Hypoxanthin neben einem Rest von Heteroxanthin, 1-Methylxanthin und das Paraxanthin. Man fällt sie wieder in Verbindung mit Silberoxyd oder Kupferoxydul und dampft die Lösung der in Freiheit gesetzten Basen ein. Der Rückstand wird in wenig verdünnter Salzsäure gelöst, die Lösung verdunstet und das Verdampfen nach Zusatz von Wasser mehrmals wiederholt, endlich der Rückstand mit wenig kaltem Wasser digeriert. Im Rückstand befindet sich Heteroxanthin und 1-Methylxanthin, welche durch 3,3%ige Lauge getrennt werden. Der in der Lösung befindliche Rest des Hypoxanthins und das Paraxanthin werden zur Beseitigung der Salzsäure wieder in die Silber- oder Kupferoxydulverbindung übergeführt, die gefällten Basen isoliert, die Lösung zur Trockene verdunstet und der Rückstand in möglichst wenig auf das 10 fache verdünnter warmer Salpetersäure gelöst. Die Mutterlauge von dem auskrystallisierten Hypoxanthinnitrat enthält das Paraxanthin, welches, in Freiheit gesetzt, sehr rein in Nadeln auskrystallisiert; das Paraxanthin könnte aus der Mutterlauge auch in Form seines Natriumsalzes gewonnen werden.

Falls unter den Basen auch Guanin enthalten ist, so findet sich dasselbe zum geringeren Teil beim Xanthin; der grössere Teil wird zugleich mit dem Epiguanin abgeschieden und lässt sich von diesem durch heisses (schwach ammoniakhaltiges) Wasser trennen, wobei das Epiguanin in Lösung geht, das Guanin zurückbleibt.

Zweckmässig wird das Guanin durch direkte Behandlung der Mutterlaugen der Harnsäure mit Ammoniak entfernt. Auf je 50 ccm setzt man 30 ccm 10%iges Ammoniak zu. Nach 24 Stunden filtriert man ab

<sup>1)</sup> l. c.

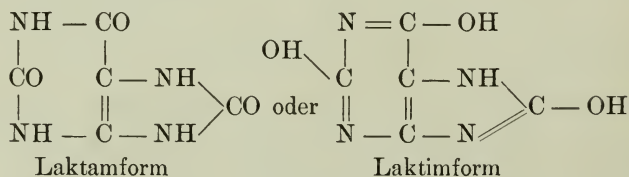
und digeriert den Niederschlag mit 2%igem Ammoniak. Mit dem Filtrat verfährt man genau wie oben (Aufteilung in die Xanthin- und Hypoxanthinfraktion) eventuell nach nochmaliger Fällung mit ammoniakalischer Silberlösung und Zerlegen der Fällung. Das Guanin löst man zur Reinigung in Natronlauge und fällt es mit Essigsäure aus. Zur Analyse stellt man zweckmässig das mit  $2\text{H}_2\text{O}$  krystallisierende Sulfat dar.

### Anhang.

Theobromin und Kaffein. Da die beiden weder durch ammoniakalische Silberlösung noch durch Kupfersulfat und Bisulfit gefällt werden, benützte Krüger<sup>1)</sup> die Phosphorwolframsäure zu ihrer Fällung. Es wird genau nach Hofmeister verfahren (s. S. 873). Die Kynurensäure fällt zusammen mit der Harnsäure beim Entfernen des Baryts mit Schwefelsäure aus. Im Filtrat werden die übrigen Basen durch Kupfersulfat und Bisulfit niedergeschlagen. Das Kaffein und Theobromin gehen in das Filtrat. Dieses wird durch Schwefelwasserstoff entkupfert und nach starkem Einengen das Kaffein und Theobromin mit Chloroform ausgeschüttelt. Das Chloroform wird auf dem Wasserbade verjagt und der Rückstand in Wasser gelöst. In der Lösung bewirkt Silbernitrat eine Fällung von Theobromin, welche durch wenig Ammoniak vermehrt wird, aber schon in geringem Ammoniaküberschuss löslich ist. Man vertreibt diesen durch Wegkochen und filtriert das Theobrominsilber ab. Das Filtrat wird angesäuert und ihm mit Chloroform das Kaffein entzogen.

### C. Die Harnsäure.

2-6-8-Trioxypurin.  $\text{C}_5\text{H}_4\text{N}_4\text{O}_3$ . Mol.-Gew. 168. C = 35,71%; H = 2,38%; N = 33,33%.



Die Harnsäure wurde von Scheele im Jahre 1776 im menschlichen Harn entdeckt<sup>2)</sup>, von Pearson in den Gichtknoten im Jahre 1798<sup>3)</sup>.

<sup>1)</sup> B. B. 32. 2818. 1899.

<sup>2)</sup> Opuscula 2. 73. 1776.

<sup>3)</sup> Phys. transac. of the roy. soc. London 15. 1798.

**Vorkommen:** Die Harnsäure findet sich in allen Säugetierharnen vor, auch bei purinfreier Kost und im Hunger. Dass sie daselbst nicht immer, insbesondere bei den fleischfressenden, gefunden wurde, scheint in ungenauer Methodik begründet zu sein. Im Harn des Hundshais hat sie Herter<sup>1)</sup>, im Harn des Karpfens Rywosch<sup>2)</sup> vermisst. In grosser Menge ist sie in den Exkrementen der Sauropsiden enthalten. Frischer Peruguano enthält 14—20% Harnsäure (Löwe<sup>3)</sup>). Auch in den Exkrementen der Schnecken und Insekten ist sie nachgewiesen worden. Die Substanz der weissen Schmetterlingsschuppen besteht aus Harnsäure.

**Synthesen:** 1. Durch Schmelzen von Glykokoll oder Trichlormilchsäureamid mit Harnstoff (Horbaczewski<sup>4)</sup>). 2. Aus Isodialursäure und Harnstoff (R. Behrend und Roosen<sup>5)</sup>). 3. Durch Erhitzen von Pseudoharnsäure (Fischer und Ach<sup>6)</sup>). 4. Das nach der Traubeschen Synthese erhaltene Diamino-Dioxypyrimidin gibt mit Chlorkohlensäureester ein Urethan, welches bei 180°—190° in Harnsäure und Alkohol zerfällt (W. Traube<sup>7)</sup>). Ausser durch diese Synthesen ist die Konstitution der Harnsäure noch bestimmt durch den Abbau zu Alloxan und Harnstoff (Liebig und Wöhler<sup>8)</sup>) und den Abbau der zwei Monomethylharnsäuren zu Methylalloxan und Harnstoff bzw. zu Alloxan und Methylharnstoff (E. Fischer<sup>9)</sup>).

**Physiologisches Verhalten:** Die Harnsäure entsteht im Organismus der Sauropsiden zum überwiegenden Teile synthetisch. Die Synthese erfolgt in der Leber aus milchsaurem Ammon. Nach Leberexstirpation, nicht aber nach Unterbindung nur eines Teils der Lebergefässe und nach nur teilweiser Leberexstirpation, verschwindet die Harnsäure aus dem Harn der Vögel (Gänse) fast vollständig<sup>10)</sup>. Dafür tritt im Harn milchsaures Ammoniak auf<sup>10)</sup>. Bei der Durchblutung der überlebenden Vogelleber mit milchsaurem Ammoniak entsteht Harnsäure<sup>11)</sup>. Zugeführten Harnstoff verwandeln die Vögel in Harnsäure und scheiden diese aus<sup>12)</sup>. Doch hat dieses Vermögen eine Grenze, wird noch mehr Harnstoff zugeführt, so wird er unverändert ausge-

<sup>1)</sup> Mitt. a. d. zool. St. Neapel. **10.** 341. J. T. 1891. 309.

<sup>2)</sup> Wiener med. Wochenschr. 1893. 47.

<sup>3)</sup> Journ. f. prakt. Chem. **96.** 409.

<sup>4)</sup> Monatsh. f. Ch. **3.** 796. 1882; **6.** 356. 1885; **8.** 201. 1887.

<sup>5)</sup> Ann. Ch. u. Pharmacie. **251.** 240. 1889.

<sup>6)</sup> B. B. **28.** 2473. 1895; **30.** 559. 1897.

<sup>7)</sup> B. B. **33.** 3045. 1900.

<sup>8)</sup> Ann. d. Ch. u. Ph. **26.** 256. 1838.

<sup>9)</sup> B. B. **17.** 1716, 1785. 1884.

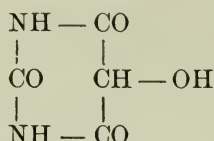
<sup>10)</sup> O. Minkowski, Arch. f. exp. Path. u. Pharm. **21.** 41. 1886; **31.** 214. 1893.

<sup>11)</sup> Kowalewski und Salaskin, Zeitschr. f. ph. Ch. **33.** 210. 1901.

<sup>12)</sup> Hans, Horst Mayer, Dissertation. Königsberg.



schieden<sup>1)</sup>. Durch gleichzeitige Zufuhr von Glycerin, Hydrakrylsäure, Milchsäure, Brenztraubensäure, Malon-, Tartron-, Mesoxal- und  $\beta$ -Oxybuttersäure wird das Vermögen der Vögel, aus Harnstoff Harnsäure zu bilden, gesteigert<sup>1)</sup>. Propion-, Butter-,  $\alpha$ -Oxybutter-, Bernstein- und Äpfelsäure sind unwirksam<sup>1)</sup>. Die Synthese findet also aus Harnstoff und einer dreigliedrigen Kohlenstoffkette wahrscheinlich über Dialursäure (Tartronylharnstoff) statt<sup>1)</sup>.



Ausser dieser synthetischen Harnsäurebildung findet im Vogelorganismus auch eine oxydative Harnsäurebildung statt, aus den im Stoffwechsel freiwerdenden Purinen. An entlebte Gänse verfüttertes Hypoxanthin wird zu 70% als Harnsäure ausgeschieden<sup>2)</sup>. Dieser Teil der von den Vögeln ausgeschiedenen Gesamtharnsäure ist jedoch im Vergleich zu dem synthetisch entstandenen gering. Die Harnsäure wird von den Vögeln zum Teil wenigstens in fester Form als ein Gemenge von Biurat und Harnsäure ausgeschieden. Die Angaben von Roberts<sup>3)</sup>, dass im unzersetzten Harn der Vögel und Schlangen die Harnsäure als Tetraurat enthalten sei, sind irrtümlich, da Tetraurate (Hemiurate, zweifachsaure Salze) nicht existieren (s. S. 1016). Unterbindet man bei Vögeln die Nieren oder schädigt sie durch Vergiftung der Tiere mit Chromsalzen u. a., so lagert sich allenthalben im Organismus Harnsäure als Monourat in fester Form ab<sup>4)</sup>. Ähnliche Harnsäureablagerungen, insbesondere an den Extremitäten, entstehen infolge ausschliesslicher Fleischfütterung bei Hühnern<sup>5)</sup>. Diese letztere experimentelle „Vogelgicht“ lässt sich durch reichliche Zufuhr von Kalzsalzen vermeiden<sup>4)</sup>.

Im Organismus der Säugetiere (Fische, Amphibien?) entsteht die Harnsäure ausschliesslich oxydativ aus den im Körper freiwerdenden oder mit der Nahrung eingeführten Purinen. Im Säugetier findet keine Harnsäuresynthese statt. Die Angaben über eine solche

<sup>1)</sup> H. Wiener, Beiträge zur ch. Phys. u. Path. Herausg. von Fr. Hofmeister. 2. 42. 1902.

<sup>2)</sup> v. Mach, Arch. f. exp. Path. u. Pharm. 24. 389. 1888.

<sup>3)</sup> On the chemistry and therapeutics of uric acid gravel and gout. (Croonian lecture for 1892). London. Smith, Elder & Co. 1892. 9.

<sup>4)</sup> Ebstein, Natur u. Behandlung der Gicht. Wiesbaden 1882.

<sup>5)</sup> Kionka, Arch. f. exp. Path. u. Pharm. 44. 186. 1900.

<sup>6)</sup> Kionka, ebenda, 44. 207. 1900.

haben sich, soweit sie nachgeprüft sind, als irrtümlich erwiesen. Kossel und Steudel haben die Vermutung geäußert, dass gewisse Pyrimidinderivate im Organismus zu Harnsäure synthetisiert werden könnten<sup>1)</sup>. Doch fehlt es dieser Vermutung an der experimentellen Begründung<sup>2)</sup>. H. Wiener hat auf Grund von Überlebensversuchen angenommen, dass die Säugetierleber einer ähnlichen Synthese der Harnsäure aus Dialursäure und Harnstoff bzw. aus Harnstoff und Tartronsäure fähig sei, wie der Vogelorganismus. Beim Schütteln von Rinderleberbrei wurde mehr Harnsäure gebildet, wenn die genannten Substanzen zugegen waren. Wiener hat dann auch beim Menschen eine geringe Wirkung von der Fütterung der genannten Säuren auf die Harnsäureausscheidung zu sehen geglaubt<sup>3)</sup>. R. Burian hat gezeigt, dass das Ergebnis der Wiener'schen Leberversuche nicht durch eine Harnsäuresynthese, sondern durch eine katalytische Beschleunigung der oxydativen Harnsäurebildung in der überlebenden Rinderleber zustande kommt<sup>4)</sup>. Wie Tartron- und Dialursäure wirkt auch die Salicylsäure, doch hängt die Wirkung nicht etwa von einer Abnahme der Alkaleszenz ab. Ascoli und Izar beobachteten eine Neubildung von durch Hundeleber zerlegter Harnsäure bei Luftabschluss und Kohlensäureanwesenheit<sup>5)</sup>. Diese Neubildung der Harnsäure beruht nach den mitgeteilten Versuchen auf der Anwesenheit eines koktostabilen, alkohollöslichen Koferments in der Leber und einem thermolabilen Ferment im Blutserum. Das letztere verliert beim Hungertier seine Wirksamkeit. Blut und Leber können von verschiedenen Tieren stammen (z. B. Truthahn und Hund). Beim Studium des Ganges dieser Synthese wurde gefunden, dass von allen untersuchten Säuren mit dreigliedriger Kohlenstoffkette nur Dialursäure zusammen mit Harnstoff bei Kohlensäureanwesenheit in der Leber Harnsäure bildet. Die Harnsäurebildung findet unter diesen Umständen auch beim Durchleiten durch die überlebende Leber statt. Eine Nachprüfung dieser Beobachtungen liegt nicht vor, doch teilt Schittenhelm mit, dass ihm das Grundexperiment (Neubildung zersetzter Harnsäure in der Hundeleber in einer Kohlensäureatmosphäre) nicht gelungen sei<sup>6)</sup>. Ich selbst habe den Versuch einmal angestellt und wie Schittenhelm ein negatives Resultat gehabt. Hierher gehört auch die Angabe von

<sup>1)</sup> Zeitschr. f. ph. Ch. **38**. 58; **39**. 136.

<sup>2)</sup> Ebenda. **43**. 494. 1905.

<sup>3)</sup> Arch. f. exp. Path. u. Pharm. **42**. 275. 1899. Beitr. z. ch. Phys. u. Path. **2**. 42. 1902.

<sup>4)</sup> Zeitschr. f. ph. Ch. **43**. 479. 1905.

<sup>5)</sup> Ascoli und Izar, Ebenda. **62**. 1909. — L. Preti, Ebenda. **62**. 354. 1909. — Bezzola, Izar und Petri, Bioch. terap. sperim. **1**. 241. 1909. — Izar, Zeitschr. f. ph. Ch. **65**. 78. 1910. — Izar, Ebenda. **73**. 317. 1911.

<sup>6)</sup> Oppenheimers Handbuch der Biochemie. G. Fischer, Jena 1911. **4**. 505.

Traetta-Mosca und F. Apolloni; dass sich in der Kälberleber aus Cholesterin und Ammoniak Harnsäure bilde. Bei dieser Synthese soll aus Cholesterin  $\alpha$ -Oxybuttersäure und aus Ammoniak zunächst Harnstoff werden<sup>1)</sup>. Kohlensäure begünstigt die Harnsäurebildung und wie Cholesterin wirkten auch Glycerin, Gärungsmilchsäure und Buttersäure in Kohlensäureatmosphäre Harnsäure bildend<sup>2)</sup>. In allen diesen Fällen dürfte es sich wie in den Versuchen von Wiener um durch irgendwelche Umstände beschleunigte oxydative Harnsäurebildung aus den Organpurinen bzw. um gleichzeitige Hemmung der oxydativen Weiterzerstörung der gebildeten Harnsäure handeln.

Die Harnsäure ist beim Menschen und anthropoiden Affen das Hauptendprodukt des Purinstoffwechsels, bei den übrigen Säugetieren kommt ihr jedoch nur die Rolle eines Zwischenprodukts zu. Mit Ausnahme des Menschen und der anthropoiden Affen scheiden die Säugetiere nur wenig Harnsäure aus im Vergleich mit den Mengen von Allantoin, welches bei ihnen das Hauptendprodukt des Purinstoffwechsels darstellt. Die Harnsäure wird von den meisten Säugetieren nahezu quantitativ zu Allantoin oxydiert und dieses im Harn ausgeschieden. Der Mensch jedoch vermag die in seinem Körper entstehende Harnsäure nicht weiter zu zersetzen. Als Beweise für die Unzerstörbarkeit der Harnsäure im Menschen können folgende Punkte angeführt werden: 1. Die Grösse der endogenen Harnsäureausscheidung zeigt pro Individuum und Tag einen sehr konstanten Wert, wiewohl die exogene Ausscheidung einen oft beim selben Individuum sehr wechselnden Betrag von der Einfuhr ausmacht. Daraus kann geschlossen werden, dass die einmal entstandene Harnsäure vollständig als solche ausgeschieden wird, dass aber aus den von aussen zugeführten Vorstufen nicht allemal der gleiche Betrag an Harnsäure für den Stoffwechsel jenseits des Darms hervorgeht. 2. Parenteral eingeführte Purine werden vom Menschen nahezu vollständig als Harnsäure ausgeschieden. 3. Den Organen des Menschen fehlt zum Unterschiede von den Organen der übrigen Säugetiere jedes harnsäurezerstörende Vermögen, wiewohl ihnen insbesondere das Vermögen der oxydativen Harnsäurebildung ebenso wie den Organen der übrigen Säugetiere in reichem Masse zukommt, die Purinfermente also mit alleiniger Ausnahme der Uricooxydase gut nachweisbar sind. Frühere Versuche von Pfeifer, Croftan und Schittenhelm, welche eine Harnsäurezersetzung in menschlichen Organen zu beweisen schienen, waren mit einer unrichtigen Methode angestellt<sup>3)</sup>. Dementsprechend ist denn auch Harnsäure in den Organen

<sup>1)</sup> Gazz. chim. ital. 40. II. 368. 1911.

<sup>2)</sup> F. Traetta-Mosca und Golda Mizenbacher, ebenda, 40. II. 378. 1911.

<sup>3)</sup> Wiechowski, Arch. f. exp. Path. u. Pharm. 60. 185. 1909. — Müller und Jones, Zeitschr. f. ph. Ch. 61. 395. 1909. — Schittenhelm, ebenda, 63. 248. 1909.



und dem Blute des Menschen nachweisbar, insbesondere, wenn die Ausscheidung gehemmt ist (Nephritis)<sup>1)</sup> oder wenn infolge besonderer Umstände (Pneumonie, Leukämie)<sup>2)</sup> die Produktion gesteigert ist oder schliesslich, wenn Vorstufen zugeführt werden<sup>3)</sup>. In Transsudaten und Exsudaten kommt immer Harnsäure vor<sup>4)</sup>. In der Norm und bei purinfreier Ernährung ist der Harnsäuregehalt des Blutes niedriger, aber Harnsäure ist unter diesen Umständen, entgegen den Angaben von Brugsch und Schittenhelm<sup>5)</sup>, doch stets im Blute zu finden (Bass, unveröffentlicht).

Da die geringen Mengen von Purinbasen und Allantoin, welche der Mensch im Harn neben der Harnsäure ausscheidet, vernachlässigt werden können, so gilt alles, was oben (S. 906 ff.) über die Physiologie, Pathologie und Pharmakologie der Gesamtpurinausscheidung gesagt worden ist, soweit der Mensch in Betracht kommt, für die Harnsäure. So ist insbesondere die Harnsäureausscheidung bei purinfreier Kost (die endogene Harnsäureausscheidung) pro Tag und Individuum eine konstante Grösse, wenn auch nicht mit jener Schärfe, wie die Gesamtpurinausscheidung<sup>6)</sup>. Sie beträgt für den gesunden Menschen zwischen 0,2 und 0,6 g Harnsäure. Beim Neugeborenen ist sie in den ersten Lebenstagen verhältnismässig hoch, 80—100 mg, um etwa vom 5. Tage ab bei Brustnahrung in der Norm auf niedrige Werte (30—40 mg) zu sinken<sup>7)</sup>. Durch jede purinhaltige Nahrung wird die Harnsäureausscheidung des Menschen erhöht. Kaffee und Cacao haben aber einen kaum merklichen Einfluss auf die Harnsäureausscheidung des Menschen. Steigernd wirken auf die Harnsäureausscheidung des Menschen: Pilocarpin, Glycerin, die Phosphorvergiftung, die Radiumemanation, das Thorium-X und insbesondere das Atophan; herabsetzend: Atropin, Chinin und insbesondere das Calciumchlorid. Die Zufuhr von Alkalien und von Hippursäurebildnern ist unwirksam. (Die Literatur zu diesen Angaben und weitere s. S. 914.)

Bei allen anderen Säugetieren, ausser dem Menschen und dem anthropoiden Affen, nimmt die Harnsäure im Harn neben dem Allantoin eine ganz untergeordnete Stellung ein. Alle die Stoffwechseleinflüsse,

<sup>1)</sup> Magnus-Levy, Berliner klin. Wochenschr. **33**. 389. 416. 1896. — Petren, Arch. f. exp. Path. u. Pharm. **41**. 265. 1898. — Brugsch, Med. Kl. 1906. 294. — Brugsch und Schittenhelm, Zeitschr. f. exp. Path. u. Therap. **4**. 444. 1907.

<sup>2)</sup> S. 913.

<sup>3)</sup> Weintraut, Wiener klin. Rundschau. 1906. Nr. 1. — Bloch, D. Arch. f. klin. Med. **83**. 517. 1905. — Vgl. auch v. Jaksch, Vorkommen von Harnsäure und Xanthinbasen im Blute. Berlin 1891.

<sup>4)</sup> G. Galdi und Appiani, Rif. med. **20**. 1373. 1904.

<sup>5)</sup> Zeitschr. f. exp. Path. u. Ther. **4**. 438. 480. 1907.

<sup>6)</sup> Kennaway s. S. 911.

<sup>7)</sup> A. Niemann, Jahrb. f. Kinderheilk. **71**. 216. 1910.



welche die Harnsäureausscheidung des Menschen verändern, lassen daher die Harnsäureausscheidung der übrigen Säugetiere ganz unbeeinflusst

Soweit die Physiologie, Pathologie und Pharmakologie des Purinstoffwechsels die Ausscheidung der Harnsäure beim Menschen beeinflussen, ist oben (S. 913 ff.) alles gesagt, hier ist nur noch auf jene Momente einzugehen, welche die Ausscheidbarkeit der Harnsäure als solcher beherrschen. Die Harnsäure ist im Organismus fast vollständig als Monourat vorhanden. Eine andere Form ist bei der aktuellen Reaktion des Organismus unmöglich (Gudzent<sup>1</sup>). Die Vermutung von Minowski<sup>2</sup>), dass die Harnsäure in einer organischen Verbindung, etwa mit Nukleinsäure, kreise, haben der Nachprüfung nicht standgehalten<sup>3</sup>). Das Monourat wird von den Stätten seiner Bildung ins Blut und aus diesem in die Nieren ausgeschieden, wobei seine Schwerlöslichkeit von Einfluss sein wird. Es muss mit der Möglichkeit gerechnet werden, dass das Urat in den Geweben zurückgehalten wird (gestaut, deponiert) nach Art der Wasser- oder Chlordeponierung in der Muskulatur und Haut, ohne dass es zu umschriebenen Ablagerungen festen Salzes, wie sie in den gichtischen Tophis vorliegen, kommt. Ja manche Erfahrungen der jüngsten Zeit legen sogar die Möglichkeit nahe, dass der menschliche Organismus auf eine vielleicht individuell verschiedene und durch Krankheit und Pharmaka verschiebbare Konzentration seiner Säfte an Harnsäure eingestellt sei. Wovon im einzelnen die physiologische Zurückhaltung eines Teils der gebildeten Harnsäure abhängig ist, weiss man nicht, dass sie aber stattfindet, scheint ziemlich sicher zu sein. Die Erfahrungen, die man beim Studium der Atophanwirkung gemacht hat, lassen sich anders kaum erklären. An beiden Punkten der Ausscheidung, der Ausscheidung ins Blut und der Ausscheidung in die Niere, können pathologische Zustände und Pharmaka angreifen. Die Ausscheidung in den Harn selbst erfolgt wahrscheinlich durch einen echten Sekretionsvorgang in den Tubulis und ist möglicherweise einer isolierten Beeinflussung oder Schädigung bei sonst in nichts geänderter oder gestörter Funktion des Organs zugänglich. Bei der Ausscheidung in den Harn erleidet der Zustand der Harnsäure insofern eine Änderung, als die Niere aus dem Blute eine Flüssigkeit von höherer Acidität bildet, und es wird von dem wahren Grade dieser Acidität und der Stärke der Harnsäure abhängen, wieviel von der ausgeschiedenen Harnsäure als Urat und wieviel als freie Säure im Harn zugegen ist. Die Beschleunigung der Harnsekretion durch Wassertrinken oder durch

<sup>1</sup>) Deutsche med. Wochenschr. 21. 1909; Zeitschr. f. ph. Ch. 63. 1909.

<sup>2</sup>) Die Gicht, Wien 1903, A. Hölder.

<sup>3</sup>) Schittenhelm, Zeitschr. f. exp. Path. u. Th. 7. S. 110. — Brugsch, ebenda, 6. 287. 1909.

Diuretica wirkt nicht auf die Harnsäureausscheidung des Menschen. Dagegen wirken das Atophan und, zum Teil wenigstens, die Salicylsäure so. Vielleicht auch die radioaktiven Substanzen, obwohl deren Hauptwirkung sicherlich in einer erhöhten Harnsäurebildung infolge der durch sie bedingten Leukocytose besteht. Alkohol wirkt vielleicht hemmend auf die Ausscheidung (s. S. 914). Die Alkalien sind unwirksam. Übrigens ist es weiteren Untersuchungen vorbehalten zu entscheiden, inwiefern die oben angegebenen Wirkungen anderer Substanzen auf einer Beeinflussung des Stoffwechsels oder der Ausscheidung als solcher beruhen. — An welchem Punkte der Ausscheidung die genannten Mittel angreifen, ist noch nicht mit Sicherheit ermittelt. Das Atophan scheint an der Niere anzugreifen, da auf der Höhe seiner Wirkung die Blutharnsäure nicht vermehrt ist<sup>1)</sup>. Entzündliche Schädigungen der Niere bei der Nephritis setzen sehr bald das Ausscheidungsvermögen der Niere für Harnsäure herab. Dass die im Organismus zurückgehaltene Harnsäure ihrerseits pharmakologische Wirkungen hervorzubringen vermag, sei hier nur nebenbei erwähnt. (Wirkungen auf die Muskulatur, das Herz, das Vasomotorenzentrum und die peripheren Gefässe, auf die Niere selbst. Bei Kaninchen erweist sich die Harnsäure, trotzdem sie weitgehend zerstört wird, als Nierengift, sie erzeugt Albuminurie.)

Mit einer pathologisch besonders gesteigerten Retention von Harnsäure im Körper hat man es bei der Gicht zu tun. Bei derselben findet man bei meist etwas verminderter Ausscheidung<sup>2)</sup> einen vermehrten Harnsäuregehalt des Blutes<sup>3)</sup>. Doch bildet das Vorhandensein von Harnsäure im Blute bei purinfreier Kost an sich kein Zeichen von Gicht, sondern ist, wie wir gefunden haben, normal. Ferner ist die exogene Purinausscheidung vermindert und verschleppt<sup>4)</sup> und schliesslich kommt es zu Ablagerungen von festem Monourat an verschiedenen Stellen des Körpers, insbesondere in den Gelenks- und anderen Knorpeln und unter der Haut. Brugsch und Schittenhelm charakterisieren die echte „Stoffwechselgicht“ durch verlangsamte Bildung, verlangsamte Zersetzung und verlangsamte Ausscheidung der Harnsäure bei Ausschluss jeder renalen Retention und trennen sie von der Retentionsgicht (Bleigicht), für deren Zustandekommen eine renale Komponente als bedeutungsvoll herangezogen wird. Nach dem, was oben über die Zerstörbarkeit der Harnsäure im Menschen gesagt worden ist, kann ich diese Theorie in dem Punkte, wo sie auf eine in der

<sup>1)</sup> Deutsch, vgl. dagegen: Dohrn, Zeitschr. f. kl. Med. **74**. Heft 5/6. 1912. und Retsloff, Zeitschr. f. exp. Path. u. Th. **12**. S. 307.

<sup>2)</sup> a) Zeitschr. f. exp. Path. u. Th. **4**. Mehrere Mitteil. 1907.

<sup>3)</sup> Garrod, Researches on gout. Medico-chir. Transac. **25**. 83. 1848. **37**. 49. 1854; deutsch von Eisenmann, Würzburg 1861. — Klemperer, Deutsch. med. Wochenschr. **21**. 655. 1895. — Magnus-Levy, Berliner klin. Wochenschr. **33**. 389. 416. 1896. — Brugsch und Schittenhelm, Zeitschr. f. exp. Path. u. Th. **4**. l. c. 1907. — Salecker, Deutsch. Arch. f. klin. Med. **95**. 353. 1909.

<sup>4)</sup> Brugsch und Schittenhelm, Zeitschr. f. exp. Path. u. Th. **4**. l. c. 1907.

Norm vorhandene, beim Gichtiker aber herabgesetzte, Harnsäurezerstörung Bezug nimmt, nicht anerkennen, da nach meiner Überzeugung kein Beweis für, aber sehr zahlreiche gegen die Fähigkeit des Menschen, Harnsäure zu zersetzen, beigebracht worden sind. Alle Erscheinungen scheinen befriedigend durch Retention der Harnsäure ohne Annahme einer Störung des Purinstoffwechsels erklärlich zu sein. Dass diese Retention zu einem Teil wenigstens durch das Verhalten der Niere bedingt ist, dafür spricht die Vermehrung der Harnsäure im Blute und die Verminderung im Harn. Die Ablagerung des Urats wird durch seine Schwerlöslichkeit sehr begünstigt. Nach Gudzent's Berechnung enthält das Blut des Gichtikers manchmal so viel Urat, dass es als eine übersättigte Lösung der schwer löslichen Laktimform des Mononatriumsalzes anzusehen ist<sup>1)</sup>. Ist Monourat einmal in fester Form abgeschieden, so verhindert seine Schwerlöslichkeit erst recht die Beseitigung der Ablagerungen. Selbst bei Tieren mit lebhafter Harnsäureoxydation wird Urat nach reichlicher Beibringung von gelöstem Salz abgelagert und in Aufschwemmung injiziertes festes Salz (künstlicher Tophus) bleibt sehr lange Zeit unverändert liegen (Kaninchen). Dass die Zufuhr von Alkalien, Lithiumsalzen und anderen Stoffen, welche Harnsäure im Glase leicht lösen oder sich mit dem Natriumurat zu leichter löslichen Salzen umsetzen sollen, auf die Resorption und Entfernung der Uratdepots des Körpers unmittelbar keinen Einfluss haben kann, ist von His und Paul sowie von Gudzent nachgewiesen worden (vgl. hierüber die ausgezeichnete Darstellung in Höbers Physikalischer Chemie der Zelle und Gewebe, II. Auflage, Seite 119). Gewisse Gewebe scheinen eine besondere Veranlagung für die Bildung von Ablagerungen festen Urats zu haben. Das hängt möglicherweise mit ihrem besonderen Reichtum an frei gelösten Natriumsalzen zusammen. Das an sich schon schwer lösliche Natriumurat wird infolge Anwesenheit von anderen gelösten Natriumsalzen noch weit schwerer löslich. So imbibiert sich gelöstes Natriumurat in in die Lösung gebrachte Knorpelstücke und fällt im Innern derselben kristallinisch aus. Auch ein Teil der Kaninchen intraperitoneal einverleibten Harnsäure wird im Knorpel abgelagert (Almagia<sup>2)</sup>). Anders als festes Urat verhält sich injizierte feste Harnsäure. Beim Kaninchen entstehen danach Uratablagerungen, beim Hunde nicht. Die Harnsäure wird zunächst leicht gelöst und fällt dann als Natriumurat aus. Ebenso ist die Lösung der Harnsäure im Serum, in menschlicher Hydrokelenflüssigkeit, ja in alkalischen, natriumhaltigen, wässrigen Lösungen von einem

<sup>1)</sup> Gudzent, Zeitschr. f. phys. Chem. **63**. 453. 1909. — Ziegler, 16. intern. med. Kongr. Budapest 1909. — Bechhold und Ziegler, Bioch. Z. **20**. 189. 1909.

<sup>2)</sup> Almagia, Hofmeisters Beitr. z. ch. Phys. u. Path. **7**. 466. 1905. — Brugsch u. Citron, Zeitschr. f. exp. Path. u. Th. **5**. 401. 1908.



Ausfallen von Natriumurat gefolgt (Ziegler). Die Bildung von Uratablagerungen nach Injektion von fester Harnsäure beim Kaninchen kann man durch Salzsäurezufuhr verhindern, beim Hunde durch Zufuhr von Alkalien hervorrufen<sup>1)</sup>. Diese Erfahrungen werden erklärlich, wenn angenommen werden kann, dass die Zufuhr von Säure einen Natriumverlust des Organismus zur Folge hat, was in der Tat der Fall ist<sup>2)</sup>. Je reicher ein Organismus an freigelösten Natriumsalzen ist, um so mehr muss er zur Ablagerung von Natriumurat neigen. Entfernt man den Natriumüberschuss, so muss diese Neigung zurückgehen. In diesem Sinne ist es nun auch nicht ausgeschlossen, dass die Zufuhr von viel Lithium- oder Kaliumsalzen dem Ausfallen von Natriumurat in den Geweben indirekt entgegen wirkt, indem sie wahrscheinlich die Ausscheidung von Natrium aus dem Körper befördert. Die Erfahrungen der letzten Zeit sprechen dafür, dass sich die einzelnen Kationen im Körper bis zu einem gewissen Grade vertreten wie die Anionen (z. B. Cl und Br). Reichliche Zufuhr des einen bewirkt möglicherweise eine Stapelung auf Kosten des anderen, welches ausgeschieden wird. Wenn man bedenkt, dass die seit langem bekannte, in der Norm und in vielen pathologischen Fällen vorkommende Chlorretention höchstwahrscheinlich von einer äquivalenten Natriumretention begleitet ist, so wird die Bildung von Natriumuratablagerungen im allgemeinen verständlich und unter dem Gesichtspunkte der erwähnten Vertretbarkeit der Kationen auch die bisher kaum erklärliche Wirkung gewisser Mineralwassertrinkkuren. Dass das Glycocoll etwas mit der Ausbildung der gichtischen Ablagerungen zu tun habe, wie Kionka vermutet hat, ist schon aus dem Grunde unwahrscheinlich, weil es sich niemals um die Ablagerung von Harnsäure, sondern um die von Natriumurat handelt<sup>3)</sup>. Im übrigen ist die experimentelle Pathologie und Pharmakologie sowohl der Harnsäureausscheidung als solcher, als der Ablagerungen von festem Natriumurat kaum bearbeitet, was erklärlich ist, wenn man bedenkt, dass die meisten anzustellenden Versuche nur am Menschen gemacht werden können, da unsere Laboratoriumstiere die in ihnen entstehende und ihnen beigebrachte Harnsäure zerstören, und die erste Vorfrage, ob ein Eingriff den Purinstoffwechsel oder die Harnsäureausscheidung beim Menschen beeinflusst, direkt kaum anders als durch Blutuntersuchungen beim Menschen zu beantworten ist, zu der man selbst bei hoch ausgebildeter Technik wird grössere Quantitäten Blut nicht entbehren können. Allerdings

<sup>1)</sup> J. van Loghem, Ann. de l'inst. Pasteur. 18. 468. 1904. Arch. f. klin. Med. 85. 416. 1907; Zentralbl. f. d. ges. Phys. u. Path. d. Stoffw. 8. 244. 1907. — Vgl. auch Cohen, Berliner klin. Wochenschr. 1912. Nr. 12.

<sup>2)</sup> Luithlen, Arch. f. exp. Path. u. Pharm. 68. S. 209. 1912.

<sup>3)</sup> E. Frey, Zeitschr. f. exp. Path. u. Th. 2. 36. 1905.



kann man auf indirektem Wege im Tierexperiment erfahren, ob ein Eingriff auf den Purinstoffwechsel wirkt oder nicht: durch die Beobachtung der Allantoinausscheidung, welche sich mit der Veränderung des Purinstoffwechsels ebenfalls verändern muss. In dieser Beziehung hat z. B. das Studium der Atophanwirkung am Tiere ergeben, dass das Atophan keine oder eine herabsetzende Wirkung auf den Purinstoffwechsel hat (Starkenstein, unveröffentlicht). Bewirkt es also beim Menschen eine Harnsäurevermehrung, so kann diese nur durch eine gesteigerte Ausscheidung hervorgerufen sein.

Soviel wäre über die Physiologie, Pathologie und Pharmakologie der Harnsäureausscheidung als solcher zu sagen. Das Verhalten der Harnsäure im Harn, welches gelegentlich zur Bildung von Konkrementen in den Harnwegen führt (harnsaure Diathese, Harnsäureinfarkt), findet unten bei der Besprechung der Löslichkeit der Harnsäure im Harn Erwähnung.

Eigenschaften: 1. Die reine Harnsäure bildet ein weisses, leichtes, sich zart anfühlendes Pulver, welches aus mikroskopischen, rhombischen, durchsichtigen Täfelchen besteht.

Ganz reine Harnsäure kann nach Behrend und Roosen<sup>1)</sup> auch in rechtwinkligen Täfelchen krystallisieren. Sie tut das nach meinen Erfahrungen auch regelmässig. Eine solche reinste Harnsäure zu gewinnen, gelingt nur durch Zersetzen eines reinen Salzes durch Mineralsäure. Beim Lösen in Schwefelsäure und Fällen durch Wasser oder beim Lösen in Alkali und Fällen durch Säure werden die die Krystallform beeinflussenden Farbstoffe stets von der ausfallenden Harnsäure adsorbiert und man gelangt nie zu einem in rechtwinkligen Tafeln krystallisierenden Produkt. Stellt man jedoch Urate in der Wärme her, so bleiben die Farbstoffe, nachdem Ausfallen des Urats beim Abkühlen in den Mutterlaugen gelöst und die Salze liefern nach dem Waschen mit Wasser, durch Säure zerlegt, stets das erwähnte Produkt. Ob sich zu der beschriebenen Reinigung alle Urate gleich eignen, weiss ich nicht, ich habe stets nur mit dem Natriumurat gearbeitet.

An der unreinen Harnsäure, wie sie sich aus Harn abscheidet, sind die stumpfen Winkel der rhombischen Täfelchen abgerundet, so dass die Krystalle die Gestalt von kurzen, dicken Wetzsteinen annehmen (Taf. III. Fig. 1/2); auf den gekrümmten Seiten liegende Krystalle erscheinen als rechtwinklige Prismen. Öfter sind zwei solcher Krystalle unter rechtem Winkel durchwachsen oder lagern sich mehrere in gleicher Weise mit ihren breitesten Partien rosettenartig übereinander. Nicht selten legen sich solche wetzsteinförmige Krystalle mit ihren planen Seiten in der Weise aneinander, dass sich in der Mitte der Reihe der grösste Krystall befindet, während sich nach den Seiten immer kleinere anfügen, so dass das Aggregat einer Tonne nicht unähnlich erscheint. Es kommt auch vor, dass Harnsäurekrystalle sehr lang gestreckt, den Krystallen der Hippursäure einigermaßen ähnlich sind; sie weisen dann aber meist keine scharfe Begrenzung auf. Aus zuckerhaltigem Harn scheidet sich die Harnsäure nach Venables oft in langen, sechsseitigen Täfelchen aus.

Harnsäurekrystalle adsorbieren Farbstoffe und färben sich daher, wenn sie sich in farbstoffhaltigen Lösungen bilden. Der Krystallhabitus wird durch diese Adsorption geändert. Die Adsorption entspricht dem bekannten Exponentialgesetz. Nicht alle Farbstoffe werden adsorbiert. Von den untersuchten Farben färbten Methylviolett, Methylenblau, Patentblau und Bismarkbraun. Ponceaurot

---

<sup>1)</sup> Ann. d. Ch. u. Ph. 251. 250. 1889.

und Chinolingelb färbten nicht. Aus methylenblauhaltigen Lösungen, ebenso wie aus methylvioletthaltigen, krystallisiert die Harnsäure in gestreckten Bipyramiden, und aus Lösungen, die Bismarckbraun enthalten, in grossen, treppenförmigen, fast häutchendünnen Krystallen <sup>1)</sup>. Die aus saurem Harn spontan oder nach Ansäuern aus Harn ausfallende Harnsäure ist immer gefärbt. Die Farbe der spontanen Sedimente ist lehmgelb bis lebhaft rosenrot.

Die Farbe der schmutziggelben Sedimente rührt von Urochrom und von Urobilin her, von welchen das Urochrom chemisch gebunden ist, das Urobilin sich auswaschen lässt. Die roten enthalten Uroerythrin, welches sie an heissen Amylalkohol abgeben, ihre Lösung in heissem Wasser zeigt das Uroerythrin-Spektrum. Natron- oder Kalilauge verwandelt ihre Farbe in grün. Wiederholt hat Garrod im Uratsediment auch metallisches Hämatoporphyrin angetroffen. Phenol entzieht den Uratsedimenten keinen Farbstoff (Kramm <sup>2)</sup>). Bei Icterus kommt Gallenfarbstoff, in Karbolharn schwarzbrauner Farbstoff in ihnen vor.

Nach den Untersuchungen von Garrod <sup>3)</sup> rührt die gelbe bis braune Farbe der spontan entstandenen wetzsteinförmigen Harnsäure von Urochrom her; Urobilin ist in ihnen nicht enthalten. Aus uroerythrinreichen Lösungen (Harn) abgeschiedene Harnsäure bildet zartrote oder orangefarbene, meist unregelmässig prismatische, auch in Rosetten und Kreuzen angeordnete Krystalle; in Masse sehen die Krystalle schön rot aus. Die Grundfarbe der Wetzsteinformen ist immer durch das Urochrom bedingt. Meist enthalten solche Krystalle, die sich spontan schnell ausgeschieden haben, auch Uroerythrin. Bloss urochromhaltige Krystalle kommen vor, bloss uroerythrinhaltige nicht.

Die Krystalle aus bilirubinreichem Harn erscheinen in Masse rötlich braun, einzeln orange, die aus biliverdinreichem Harn in Masse lederbraun, einzeln grünlich; sie bilden oft Rosetten prismatischer Krystalle. Die in Karbolharn entstandenen Krystalle sind tiefbraun und fast undurchsichtig, in Masse vollkommen schwarz. Blut und die Indigfarbstoffe beteiligen sich nicht an der Färbung der spontan entstandenen Harnsäure.

Die mit Säuren ausgefällte Harnsäure verdankt ihre rötlich braune Farbe höchst wahrscheinlich grossenteils den schwarzen Zersetzungsprodukten des Urochroms (Uromelanin von Thudichum); manchmal sind sie, wie bereits Heller beobachtete, von Indigblau und Indigrot gefärbt. Wenn das Eisen, welches Kunkel in Harnsäure fand, die mit Salzsäure gefällt war, wirklich einem Farbstoff angehört, so ist das keiner der hier erwähnten.

In der Kälte aus alkalischer Lösung durch Salzsäure gefällte Harnsäure enthält nach Fritzsche stets 2 Mol. Krystallwasser, welches die Krystalle schon in geringer Wärme, im Vakuum oder in heissem Wasser abgeben. Der Niederschlag bildet anfangs eine Gallerte, und auch diese ist nach Matignon <sup>3)</sup> ein Hydrat.

Die namentlich aus verdünnten Uratlösungen durch Salzsäure in der Kälte ausfallende Harnsäure bildet fast immer durchsichtige Krystalle, welche beim Erwärmen in ihrer Mutterlauge auf dem Wasserbade rasch opak werden. Die durchsichtigen Krystalle stellen offenbar die krystallwasserhaltige Form der Harnsäure dar. Dieses Verhalten trifft man auch bei einigen Purinbasen an (S. —0).

<sup>1)</sup> R. Marc, Zeitschr. f. physikal. Chem. **75**. 710. 1911.

<sup>2)</sup> W. Kramm, Deutsche med. Wochenschr. 1896. 44.

<sup>3)</sup> A. E. Garrod, Proc. of the Roy. Society **55**. 404. 1894; Journ. of Path. and Bacteriol. Novbr. 1894. 100.

<sup>4)</sup> J. Fritzsche, Journ. f. prakt. Ch. **17**. 56. 1839. — E. Matignon, Bull. de la Soc. chim. [3] **11**. 571. 1894.

Die Harnsäure schmilzt nicht. Über das Spektrum ihrer Lösungen vgl. W. Noel Hartley<sup>1)</sup>.

2. Die physikalisch-chemischen Konstanten der Harnsäure.

Konstanten	bei 18 <sup>2)</sup>	bei 37 <sup>3)</sup>
Löslichkeit . . . . .	1:39 480	1:15 505
1 L der gesättigten Lösung enthält . . . . .	0,0253	0,0649
1 Mol. Harnsäure löst sich in $v =$ . . . . .	6640 l	2609 l
spez. Leitfähigkeit der gesättigten Lösung (Verdünnung $v$ L) $= k$ ohne Abzug der spez. Leitfähigkeit des Lösungs-Wassers . . . . .	$5,91 \cdot 10^{-6}$	$1,6 \cdot 10^{-5}$
nach Abzug der spez. Leitfähigkeit des Lösungs-Wassers . . . . .	$4,85 \cdot 10^{-6}$	$1,3 \cdot 10^{-5}$
Molekulare Leitfähigkeit der gesättigten Lösung $= k \cdot 1000 v = m$ ohne Abzug der Leitfähigkeit des Lösungs-Wassers . . . . .	39,28	41,74
nach Abzug der Leitfähigkeit des Lösungs-Wassers bei unendlicher Verdünnung $= m_{\infty}$ . . . . .	32,24 339	33,92
Dissoziationsgrad, $a = m_v / m_{\infty}$ ohne Abzug der Leitfähigkeit des Lösungs-Wassers . . . . .	0,116	0,092
mit Abzug der Leitfähigkeit des Lösungs-Wassers . . . . .	0 095	0,075
Dissoziationskonstante, $m^2 v / m_{\infty} \cdot (m_{\infty} - m_v) v = k$ ohne Abzug der Leitfähigkeit des Lösungs-Wassers . . . . .	$2,29 \cdot 10^{-6}$	$3,58 \cdot 10^{-6}$
nach Abzug der Leitfähigkeit des Lösungs-Wassers . . . . .	$1,51 \cdot 10^{-6}$	$2,33 \cdot 10^{-6}$
Wanderungsgeschwindigkeit des primären Harnsäure-Ions . . . . .	21	38
Lösungswärme . . . . .	— 8954 cal pro Mol <sup>3)</sup>	

Die Löslichkeitskurve der Harnsäure in Wasser wird nach Blarez und Denigès<sup>4)</sup> ausgedrückt durch:

$$x = 2 + 0,15 t + 0,0 020 t^2 + 0,000 025 t^3,$$

worin  $x =$  mg Harnsäure in 100 g Wasser und  $t =$  die jeweilige Temperatur.

Die früheren Angaben über die Löslichkeit sind sehr schwankend und unzuverlässig, da sie, wie His und Paul (l. c.) nachgewiesen haben, auf Grund von unzulänglichen Methoden gemacht sind. Schon geringe Verunreinigungen, wie Kohlensäure u. a. beeinflussen die Löslichkeit der Harnsäure in Wasser. Andererseits ist die Harnsäure in wässriger Lösung ziemlich leicht zersetzlich und diese Zersetzlichkeit wird durch Spuren von Alkali, wie sie aus dem Glase der Gefäße in die Lösung, namentlich beim Erwärmen übergehen, und durch längeres Erwärmen überhaupt, wie es beim Eindampfen der Lösungen notwendig ist, erheblich gesteigert. Versuche über die Löslichkeit der Harnsäure können daher nur dann verlässliche Resultate geben, wenn sie in ausgedämpften Hartglasgefäßen mit Leitfähigkeitswasser angestellt werden und das in Lösung Gegangene nicht durch

<sup>1)</sup> Proc. ch. soc. **21**. 166. 1905.

<sup>2)</sup> W. His und Th. Pauly, Zeitschr. f. ph. Ch. **31**. 1. 1900.

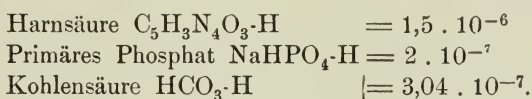
<sup>3)</sup> F. Gudzent, Zeitschr. f. ph. Ch. **60**. 25. 1909.

<sup>4)</sup> Blarez und Denigès, Comptes rendus **104**. 1847. 1887.



Eindampfen der Lösung zur Trockne, sondern durch Zurückwägen des Unge- lösten bestimmt wird. Beim Schütteln von feinverteilter Harnsäure mit Wasser ist die Löslichkeitsgrenze in einer Stunde erreicht. In einer gesättigten wässrigen Lösung sind nach der obigen Zusammenstellung bei 18° 11,6 % bzw. 9,5 % der gelösten Harnsäure in Wasserstoffionen und primäre Harnsäureionen dissoziiert. In einem Liter gesättigter Lösung beträgt die Konzentration dieser Ionen je  $1,75 \cdot 10^{-5}$  Mol bzw.  $1,43 \cdot 10^{-5}$  Mol und die Konzentration der undissoziierten Harnsäure  $1,331 \cdot 10^{-4}$  bzw.  $1,363 \cdot 10^{-4}$  Mol.

Alle gemachten Messungen stimmen damit überein, dass die Harn- säure in wässriger Lösung nur ein H-Ion abdissoziieren kann, dass sie eine einbasische Säure ist. Sie lässt sich auch als solche titrieren, schärfer nach Zusatz von Formol<sup>1)</sup>. Ihre niedrige Dissoziationskon- stante kennzeichnet sie als schwache Säure. Nach der Stärke nimmt die Harnsäure unter einigen im Organismus wichtigen Säuren folgende Stellung ein:



Die Harnsäure ist also eine stärkere Säure als die Kohlensäure und das primäre Phosphat, sie wird daher aus Bicarbonaten die Kohlensäure und aus den einfachsauren Pho- phaten das zweifachsaure Phosphat unter Bildung von Biurat verdrängen. Daher ist die Harnsäure zunächst im Serum leichter löslich als in Wasser; unter Verdrängung der Kohlensäure des Bicarbonats bildet sich Biurat, bei längerem Kontakt fällt dann ein Teil des Biurats infolge der Anwesenheit von viel Na aus (s. w. u.)<sup>2)</sup>. Das nachträgliche Ausfallen wird durch K, Li und Mg-Salze und Ra-Emanation gehemmt<sup>3)</sup>. Gleichwohl kann man durch Ein- leiten von Kohlensäure in eine Aufschwemmung von primärem harnsaurem Salz Harnsäure abscheiden. Dieses Verhalten hängt mit der sehr verschiedenen Lös- lichkeit der beiden Säuren in Wasser zusammen. 1 Mol. Harnsäure löst sich in 6636 Liter, 1 Mol. Kohlensäure in 44 Liter. In einer gesättigten Kohlensäure- lösung ist demnach die H-Ionen-Konzentration weit grösser als in einer ge- sättigten Harnsäurelösung. Dadurch, sowie durch die im Überschuss vorhan- denen Urat-Ionen wird die Dissoziation der Harnsäure soweit zurückgedrängt, dass das Löslichkeitsprodukt der Harnsäure überschritten wird und sie ausfallen muss<sup>4)</sup>. In gleicher Weise wird auch ein grosser Überschuss von zweifach- saurem Phosphat wirken, wie wohl dieses auch eine schwächere Säure als Harn- säure ist.

Ein Zusatz von Säure zu wässriger Harnsäurelösung bedingt in- folge der Zunahme der H-Ionen-Konzentration eine Zurückdrängung der Harnsäuredissoziation und damit eine Verminderung der Löslich- keit. Die früher verbreitete Ansicht, dass die Harnsäure in wässrigen Lösungen starker Säuren löslicher sei als in Wasser (z. B. in Salz- säure, R ü d e l<sup>5)</sup>), ist irrtümlich (H i s und P a u l<sup>6)</sup>). Für eine n/100

<sup>1)</sup> Sörensen, Bioch. Zeitschr. 7. 99. 1908.

<sup>2)</sup> A. E. Taylor, Journ. of biol. ch. 1. 177. 1906. — H. Trenkner, Z. f. i. M. 25. 1121. 1904.

<sup>3)</sup> Ziegler, 16. int. med. Kongr. Budapest 1909. — Bechold und Ziegler, Biochem. Zeitschr. 20. 189. 1909.

<sup>4)</sup> His und Paul, l. c.

<sup>5)</sup> Arch. f. exp. Path. u. Pharm. 30. 469. 1892.

<sup>6)</sup> Zeitschr. f. ph. Ch. 31. 1. 65. 1900.



Säure beträgt die Löslichkeit bei 18° nur mehr 1:43620. Bei einer 6n Schwefelsäure sinkt die Löslichkeit sogar (wohl infolge des Einflusses der Schwefelsäure als Lösungsmittel) auf 1:54890 (G u d z e n t<sup>1)</sup>). Die Harnsäure ist also zum Unterschiede von den Purinbasen kein amphoterer Elektrolyt, sie kann bei Anwesenheit starker Säuren keine OH-Ionen abdissoziieren. Infolge dieser Verhältnisse wird Harnsäure aus ihren Lösungen durch starke Säuren auch Essigsäure sehr vollständig gefällt. Doch ist die Fällbarkeit gewissen Hemmungen unterworfen. Insbesondere hemmend wirkt die Gegenwart von Nucleinsäure<sup>2)</sup>. Befördert wird die Abscheidung, wenn (krystallisierte Harnsäure zugesetzt und) die Flüssigkeit rotiert wird, wodurch die Übersättigung aufgehoben wird<sup>3)</sup>.

Weit besser als in Wasser ist die Harnsäure löslich in warmer konzentrierter Schwefelsäure (W e t z l a r<sup>4)</sup>), in warmem Glycerin<sup>5)</sup>, in Milch- und Essigsäure, sowie in Harnstoff. In allen diesen Fällen dürfte es sich, wie für die Schwefelsäure bewiesen (s. u.), für den Harnstoff sehr wahrscheinlich nicht um eine echte Lösung, sondern um die Bildung leicht löslicher Verbindungen handeln. Auch die Purinbasen kommen möglicherweise als löslichkeitsvermehrend in Betracht. Aus der Lösung in warmem Glycerin scheidet sich beim Stehen die Harnsäure zum Teil in würfelförmigen Krystallen wieder ab<sup>5)</sup> (unverändert als solche?). Unreine, aus Harn gefällte Harnsäure ist wenigstens scheinbar leichter löslich als reine Harnsäure. In Alkohol und Äther ist die Harnsäure unlöslich.

### 3. Verbindungen. a) Mit Basen. Die Urate.

Die Harnsäure verhält sich in wässriger Lösung als einbasische Säure. Dementsprechend existieren in wässriger Lösung nur primäre, einfachsaure Salze (Biurate). Bei Anwesenheit von starken Basen ist die Harnsäure imstande, unter Bildung sekundärer Harnsäure-Anionen noch ein zweites H-Ion abzudissoziieren und dann sekundäre (neutrale) Urate zu bilden. Diese sind aber nur in festem Zustande bzw. nur bei Anwesenheit von viel Lauge beständig. Durch Wasser werden sie sofort zu primärem Salz und Lauge zersetzt, durch Kohlensäure zu primärem Salz und Carbonat. Dies kommt daher, dass das sekundäre Harnsäure-Anion sich mit den H-Ionen des Wassers sofort zu dem kaum dissoziierten

<sup>1)</sup> Zentralbl. f. d. ges. Phys. u. Path. d. Stoffwechsels. 1910. Nr. 8.

<sup>2)</sup> Minkowski, Motonosuke Goto, Zeitschr. f. ch. Ch. 30. 473.

<sup>3)</sup> His und Paul, l. c.

<sup>4)</sup> Beiträge zur Kenntnis des menschlichen Harns. 1821. 67.

<sup>5)</sup> Colasanti, Moleschotts Untersuchungen. 13. Zeitschr. f. analyt. Ch. 22. 625.

primären Harnsäure-Anion verbindet. Es bleiben dann Salzkationen und OH-Ionen in der Lösung zurück (hydrolytische Dissoziation). Wenn aber die Dissoziation des Wassers durch viel Metallhydroxyd zurückgedrängt wird, so sind die sekundären Harnsäure-Anionen beständig — wegen Mangels verfügbarer H-Ionen — und die sekundären Salze können sich bilden. Eine Löslichkeit sekundärer Urate in Wasser gibt es also nicht, und die früheren Angaben über eine solche<sup>1)</sup> beruhen auf Irrtum<sup>2)</sup>. Die neutralen Urate können zwei verschiedene Basen zugleich enthalten. Scherer<sup>3)</sup> glaubte im Uratsediment des Harns noch eine dritte Art von Uraten gefunden zu haben, welche auf eine Metallvalenz zwei Harnsäuremoleküle enthalten, Verbindungen von je einem Molekül Biurat und Harnsäure darstellen (Quariurate, Tetraurate, dreifachsaure Urate). In dieser Form sollte die Harnsäure im Schlangen- und Vogelkot, sowie nach Flensburg<sup>4)</sup> im Harnsäure-Infarkt der neugeborenen Menschen vorliegen. Diese Salze sollten sich bei Berührung mit Wasser in Harnsäure und Biurat mit Alkalicarbonaten und einfachsaurem Phosphat in Biurat umsetzen. Sie sollten schwerer löslich sein als die entsprechenden Biurate. Das einzige geeignete Lösungsmittel wäre normaler Harn. Es sind aber auch Vorschriften gegeben worden zur Darstellung der Tetraurate in vitro.

Das Kalium- und das Natriumquadiurat lassen sich nach Roberts<sup>5)</sup> darstellen, wenn man eine Azetatlösung der betreffenden Basis (300 ccm 3 prozent. Kaliumacetat- oder 100 ccm einer 5 proz. Natriumacetatlösung) siedend heiss etwa eine Minute lang mit (2 g) Harnsäure schüttelt, heiss filtriert und das Filtrat abkühlt. Der Niederschlag wird erst mit rektifiziertem, dann mit absolutem Alkohol gewaschen und bei Blutwärme getrocknet. Lässt man das Filtrat im Wärmeschrank oder selbst im Zimmer erkalten, so treten radiär gestreifte Kugeln auf. Das Ammonquadiurat erhält man durch Kochen von 1 g Harnsäure mit 200 ccm Wasser, dem 1 ccm starke Ammoniakflüssigkeit zugesetzt ist, Abkühlen des Filtrats auf Eis und Einleiten von Kohlensäure bis zur Bildung eines voluminösen Niederschlags. Das Calciumsalz wird erhalten durch Lösen von 0,5 g Harnsäure in kaltem Kalkwasser und vorsichtiges Neutralisieren des Filtrats mit Essigsäure; das Magnesiumsalz durch zehn Minuten langes Digerieren von Harnsäure mit calcinierter Magnesia und Wasser bei Blutwärme. Quadiurat kann man nach Roberts auch darstellen, wenn man Harn mit Natrium- oder Kaliumbicarbonat schwach alkalisch macht oder besser mit 3 % Kaliumacetat versetzt zum Sieden erhitzt, eine Minute lang mit überschüssiger Harnsäure digeriert, heiss filtriert und das Filtrat abkühlt; war der Harn dabei zu schwach alkalisch, so kann Harnsäure mit ausfallen, war er zu stark alkalisch, Biurat.

Versetzt man eine kalt gesättigte Biuratlösung mit einer starken Lösung von zweifach saurem Phosphat oder mit  $\frac{1}{3}$  Vol. saurem Harn mittlerer Konzentration, so fällt Quadiurat aus (Roberts<sup>6)</sup>).

<sup>1)</sup> Allan und Bensch, Ann. d. Ch. u. Pharm. **65**. 194. 1848.

<sup>2)</sup> Höber, Physikal. Chemie der Zelle und Gewebe. II. Aufl. W. Engelmann, Leipzig 1906. — His und Paul, l. c.

<sup>3)</sup> Canstatt's Jahresberichte. 1845. Phys. Ch. **156**. — Bence Jones, Journ. of the chem. soc. **15**. 201. 1862. Chem. Zentralbl. 1862. 372.

<sup>4)</sup> Nord. med. Arch. 1894; Jahrb. f. Tierch. 1893. 581.

<sup>5)</sup> Sir Roberts, a. a. O. 25 u. 17.

<sup>6)</sup> Roberts, a. a. O. 42.

Das Quadriurat bildet wie das Biurat ein gelatinöses Hydrat; sättigt man eine 5 proz. Lösung von einfach saurem Natriumphosphat in der Hitze mit Harnsäure, so scheidet sich aus dem Filtrat beim Erkalten dieses Hydrat amorph oder in weichen durchscheinenden Kugeln ab (Roberts<sup>1)</sup>).

Die Zersetzung des Tetraurats durch Wasser lässt sich unter dem Mikroskop beobachten, wenn man das zugesetzte Wasser oft erneuert; es treten zuletzt Harnsäurekrystalle auf. — Löst man Quadriurat in der 1000 fachen Menge heissem Wasser, so fällt beim Erkalten die Hälfte der vorhandenen Harnsäure aus, die andere Hälfte bleibt als Biurat in Lösung (Roberts<sup>2)</sup>).

Nach den Untersuchungen von Tunncliffe und Rosenheim<sup>3)</sup>, sowie von Kohler<sup>4)</sup> existieren jedoch die Quadriurate als Verbindungen nicht, sondern sind lediglich ein Gemisch von Harnsäure und Biurat. Schlagend ist der Beweis von Kohler, dass sich Harnsäure in Uratlösungen nicht besser löst als in Wasser (eigentlich sollte sie darin wegen der Anwesenheit von Harnsäure-Anionen schwerer löslich sein als in Wasser).

Es kommen also für die Verhältnisse in Lösungen und für den tierischen Organismus ausschliesslich die Biurate in Betracht.

Die einfach sauren Urate der fixen Alkalien erhält man durch Behandeln einer Lösung von Harnsäure in den Alkalihydraten mit Kohlensäure (Bensch) (auch Glycocoll fällt aus alkalischen Lösungen von Diurat Monourat, Harnstoff soll diese Fällung verzögern<sup>5)</sup>) oder durch Auflösen von Harnsäure in einem Alkalicarbonat oder Alkalibicarbonat. Sie bilden sich auch mit phosphorsauren, borsauren und essigsauren Alkalien. Mit einfach saurem Phosphat entsteht zweifach saures und Biurat, die Lösung reagiert dementsprechend amphoter.

Die Biurate treten in zweierlei Formen auf, in der einer unbeständigen Gallert (als Hydrat, hydratische Form) und kristallisiert.

Aus der Lösung von Harnsäure in Alkalihydrat scheidet sich die Harnsäure beim Behandeln der Lösung mit Kohlensäure zunächst als Gallert ab, welche sich darauf in Drusen kleinerer Krystalle verwandelt (Bensch). Eine heiss gesättigte Lösung eines Alkalibiurats bleibt nach dem Erkalten lange Zeit klar; auf Zusatz des gleichen Volumens einer starken Alkalisalzlösung (20 proz. Chlornatrium, Natriumphosphat etc.) entsteht ein voluminöser, gallertiger Niederschlag, welcher später krystallinisch wird (Ord, Roberts). Behandelt man Quadriurat mit Wasser, so enthält die Lösung Biurat, welches sich durch Lösen von Kochsalz in der Lösung bis zur Sättigung gleichfalls als Gallert abscheidet. Auch ohne Fällungsmittel kann sich das Alkalibiurat aus gesättigten Lösungen allmählich gelatinös abscheiden (Roberts<sup>6)</sup>); eine heiss gesättigte Lösung von Harnsäure in Lithiumcarbonat erstarrt beim Erkalten zu einer Gallert (Bensch). Das gelatinöse Biurat stellt sich unter einem Mikroskop entweder als amorphe Masse dar, oder in der Form weicher amorpher Kugeln. Es ist leichter löslich als das krystallisierte Biurat.

Das krystallisierte Alkalibiurat (auch das Ammonbiurat) bildet entweder Kugeln, kleine Krystalle, oder lockere, aus Prismen zusammengesetzte Drusen.

<sup>1)</sup> Roberts, a. a. O. 92.

<sup>2)</sup> Roberts, a. a. O. 18.

<sup>3)</sup> The Lancet 1900. 1708.

<sup>4)</sup> Zeitschr. f. ph. Ch. 72. 169. 1911.

<sup>5)</sup> H. Kionka, Zeitschr. f. exp. Path. u. Th. 2. 1. 1905. — E. Frey, ebenda. 2. 26. 1905.

<sup>6)</sup> W. M. Ord, On the Influence of Colloids upon Crystalline Form and Cohesion. London 1879. 72. — Sir W. Roberts, a. a. O. 90 u. 117.



Für die Gewinnung von gut krystallisierendem Mononatriumurat ist es von grösster Wichtigkeit, absolut reine Harnsäure zu verwenden. Nur eine solche liefert ein schön krystallisiertes, reines Produkt mit dem theoretischen Krystallwassergehalt, wenn man sie nach den Angaben von His und Paul bzw. Gudzent in der berechneten Menge  $n/10$  Natronlauge bei  $50^{\circ}$  löst, vom ungelösten rasch abnutschet und die Lösung langsam erkalten lässt. Mit weniger reinen wenn auch analytisch einwandfreien Harnsäurepräparaten erhielten wir immer zunächst zwar scheinbar weisse, aber unter dem Mikroskope als aus bräunlichen Kugeln bestehend sich erweisende amorphe Produkte, welche den verschiedensten Versuchen, sie zur Krystallisation zu zwingen, widerstanden. Auch die allgemein geübte Reinigung der Harnsäure nach Horbaczewski (Lösen in konzentrierter Schwefelsäure und Eingiessen in Wasser) änderte bei solchen Präparaten nichts an dem Aussehen und Verhalten des aus ihnen gewonnenen Natriumurats. Wir<sup>1)</sup> haben nun gefunden, dass die die Krystallisation hemmenden Substanzen zum grössten Teile in den meist auch etwas gefärbten Mutterlaugen von dem zunächst erhaltenen amorphen Produkt gelöst bleiben. Wäscht man dieses mit Wasser alkalifrei, so erhält man nach dem Zersetzen mit Mineralsäure schon eine erheblich reinere Harnsäure, welche dem oben zitierten Verfahren unterworfen, meist ein Urat liefert, welches unter dem Mikroskope bereits eine Andeutung krystallinischer Struktur aufweist. Behandelt man dieses zweite Produkt wie das erste und das gewonnene dritte, eventuell vierte, ebenso, so gelangt man schliesslich, allerdings unter erheblichen Verlusten, aber mit Sicherheit zu einem sehr schönen Präparat, welches unter dem Mikroskop ausschliesslich tadellos gleichmässige, isolierte, nirgends agglomerierte, verhältnismässig grosse Nadeln zeigt, in Wasser suspendiert, prächtig szintilliert und nach dem Absaugen und Waschen eine seideglänzende, verfilzte, papierähnliche Masse darstellt. Manchmal muss man den gleichen Gang bis sechsmal wiederholen, bis man zu einem befriedigenden Resultat kommt<sup>1)</sup>. Dabei macht man stets die Beobachtung, dass das Urat immer schwerer löslich wird, je reiner es wird. Man ist gezwungen, zum Lösen der solcher Art über das Urat gereinigten Harnsäure stärker verdünnte Lauge:  $n/15$ — $n/20$  zu verwenden, weil bei Anwendung von  $n/10$ -Lauge fast gleichzeitig mit der bei  $50^{\circ}$  erfolgenden Lösung der Harnsäure das Urat auszukrystallisieren beginnt, so dass man mit dem Filtrieren zu spät kommt oder die Filtration infolge der vorzeitig einsetzenden Krystallisation gestört wird. Die aus solchen schönen Präparaten durch Mineralsäure gewonnene reinste Harnsäure krystallisiert nicht mehr in rhombischen, sondern in rechtwinkligen Täfelchen.

Die physikalisch-chemischen Konstanten der Biurate, des Ammoniums, Natriums und Kaliums hat Gudzent ermittelt<sup>2)</sup> (siehe die Tabelle). Die Löslichkeit nimmt beim dauernden Rotieren von überschüssigem Salze mit Wasser bei der gleichen Temperatur zunächst bis zu einem Maximum, dem Sättigungspunkt, zu. Dieser wurde von dem am schwersten löslichen Ammonsalz am schnellsten erreicht und von dem am besten löslichen Kaliumsalz am spätesten. Von diesem Punkte ab nimmt die Löslichkeit bei weiterem Rotieren allmählich mit abnehmender Geschwindigkeit ab und bleibt dann von der 140. Stunde an konstant.

Gudzent erklärt dieses Verhalten durch die Annahme zweier Reihen von primären Uraten, die sich sonst in nichts als durch die verschiedene Löslichkeit voneinander unterscheiden. Das leichter lösliche Salz ist unbeständig und geht vom Momente seiner Entstehung allmählich in das zweite, beständige, weniger lösliche über. Das un-


<sup>1)</sup> von Knaffl und Wiechowski, Zeitschr. f. phys. Ch. 77. 303. 1912.

<sup>2)</sup> Zeitschr. f. ph. Ch. 56. 150. 1908; 60. 66. 1909.



		Löslichkeitsverhältnis	In 1 l Lösung sind enthalten	1 Mol löst sich in Liter	Spezifische Leitfähigkeit	Dissoziationsgrad	Molekulare Leitfähig- keit $\nu = \infty$	Kationen	Wan- derungs- geschwin- digkeit des	Anionen	Mittlerer Wert für das Anion	Der Sättigungspunkt wird erreicht in Min.	In 1 l einer gesättigten Lösung ist	Es sind hydro- lysiert	Die Reaktion ist demnach		
Lactam-Urat (unbeständig).																	
180																	
Prim. harns. Kalium		1 : 477	2,097	99	0,000811	—	—	—	—	—	—	120	COH	$= 6,5 \times 10^{-7}$	0,0064	Schwach alka- lisch. Desgl.	
" Natrium		1 : 846	1,182	176	0,000338	—	—	—	—	—	—	45		$= 4,9 \times 10^{-7}$	0,0009	Schwach alka- lisch. Desgl.	
" Ammonium		1 : 2191	0,456	406	0,000195	—	—	—	—	—	—	15		$= 0,27 \times 10^{-7}$	0,15	Schwach sauer.	
370																	
Prim. harns. Kalium		1 : 266	3,7585	55	0,002217	berechnet	—	—	—	—	—	—	—	—	—	Schwach alka- lisch. Desgl.	
" Natrium		1 : 469	2,130	98	0,000980		—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	Schwach alka- lisch. Desgl.
" Ammonium		1 : 1225	0,817	226	0,009361		—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	Schwach sauer.
180																	
Lactim-Urat (beständig).																	
Prim. harns. Kalium		1 : 716	1,3967	148	0,000540	0,948	84,1	63,8	20,3	21	120	COH	$= 5,35 \times 10^{-7}$	0,0079	Schwach alka- lisch. Desgl.		
" Natrium		1 : 1270	0,7874	264	0,000225	0,956	63,6	43,3	20,3	—	45		$= 4,02 \times 10^{-7}$	0,001	Schwach sauer		
" Ammonium		1 : 3290	0,3039	609	0,000130	0,965	—	—	—	—	15		$= 0,27 \times 10^{-7}$	0,15	Schwach sauer		
370																	
Prim. harns. Kalium		1 : 402	2,4844	83	0,001462	0,925	131,0	93,2	37,8	38,0	15		—	—	Schwach alka- lisch. Desgl.		
" Natrium		1 : 710	1,4085	148	0,000648	0,933	103,0	65,5	37,5	—	15		—	—	Schwach sauer.		
" Ammonium		1 : 1848	0,5401	342	0,0003709	0,966	131,5	93,5	38,0	—	15		—	—	Schwach sauer.		

beständige soll der Laktamform der Harnsäure (s. o. S. 1000, Formel I.), das beständige, schwerer lösliche der Laktimform der Harnsäure (Formel II.) zugehören. Bei der Darstellung der krystallisierten Alkalibiurate erhält man immer ein Gemisch beider Salze, des schwer löslichen, beständigen b- und des leichter löslichen, unbeständigen a-Salzes. Das a-Salz ist bei 18° um 33,4%, bei 37° um 33,9% löslicher als das b-Salz. Die oben mitgeteilten Beobachtungen über die beiden Formen der Alkalibiurate, insbesondere über die leichtere Löslichkeit der gelatinösen, besser gesagt, amorphen Modifikation haben wohl sicher Beziehungen zu den von Gudzent an krystallisierten Salzen gemachten Beobachtungen. Bei der Darstellung der krystallisierten Biurate nach dem oben beschriebenen Verfahren fällt immer auf, dass das Natriumurat deutlich schwerer löslich wird, je schöner sich die Krystalle ausbilden und je reiner (d. h. frei von amorphen Teilen) das Präparat wird.

Die leichtere Löslichkeit des bei der Bildung zunächst entstehenden amorphen Urats dürfte auch die Ursache dafür sein, dass nach Bechhold und Ziegler (Biochem. Zeitschr. 20. S. 189. 1909) die Löslichkeit von Harnsäure im Serum um das 20 fache grösser ist als die vom Urat. 

Die Lösungsverhältnisse des Natriumurats und seine Lösungen zeigen übrigens noch andere Eigentümlichkeiten, welche durch die Gudzent'sche Annahme nicht erklärt werden, sondern eher für die Möglichkeit sprechen, dass die Urate auch kolloide Lösungen bilden können. So haben von Knaffel und Wichowski beobachtet, dass die durch Erwärmen bedingte Erhöhung der Löslichkeit trotz Anwesenheit von Bodenkörper beim Erkalten und langem Stehen bestehen bleibt. (Vgl. dazu Schulz, biochem. Zeitschr. 48. 85. 1913.)

Die Hydrolyse der Biurate in wässriger Lösung ist aus der Dissoziationskonstante des Wassers und der Harnsäure (bei der schwachen Ammoniumbase auch aus deren Dissoziationskonstante) und dem Gehalt der gesättigten Lösungen an Salz berechnet. Die durch die hydrolytische Dissoziation auftretende Konzentration an OH-Molen in einem Liter beträgt nach dieser Berechnung (Gudzent) beim Ka-Salz =  $5,6 \cdot 10^{-7}$  und beim Ammoniumsalz =  $0,27 \cdot 10^{-7}$ . Da der OH-Molen-Gehalt von einem Liter Wasser (der Neutralpunkt) =  $0,8 \cdot 10^{-7}$  beträgt, so muss die Lösung des Kaliumbiurats alkalisch reagieren (der OH-Gehalt seiner Lösungen liegt über dem Neutralpunkt) und die Lösung des Ammoniumbiurats sauer reagieren.

Das am leichtesten in Wasser lösliche Alkalibiurat ist das Lithiumbiurat. Es löst sich nach von Schilling in 370 Teilen kalten und 39 Teilen kochenden Wassers <sup>1)</sup>. Nach Vicario <sup>2)</sup> lösen 100 Teile Wasser von 18° 0,258 g, 100 Teile Wasser von 37° 0,276 g Lithiumbiurat. Es wird gelatinös erhalten. Nach der oben beschriebenen Methode der Darstellung des krystallisierten Natriumurats ist es mir nicht gelungen, das Lithiumbiurat krystallisiert zu erhalten.

Das Natriumbiurat krystallisiert mit einem Molekül Wasser <sup>3)</sup>, die ältere Angabe von Behrend und Roosen <sup>4)</sup> ist irrtümlich. Es ist wie das Heteroxanthin- und das Paraxanthin-Natrium in konzentrierter Natronlauge unlöslich <sup>5)</sup>. Es krystallisiert im monoklinen System <sup>6)</sup>.

Das Kaliumbiurat krystallisiert krystallwasserfrei <sup>3)</sup>.

<sup>1)</sup> Ann. d. Ch. u. Ph. 122. 241.

<sup>2)</sup> Journ. de Pharm. et de Chim. 15. 268. 1902.

<sup>3)</sup> Gudzent, l. c.

<sup>4)</sup> Ann. d. Ch. u. Ph. 251. 252. 1889.

<sup>5)</sup> Salkowski, Pfl. Arch. 56. 349. 1894.

<sup>6)</sup> Gudzent und Tannhäuser, Zeitschr. f. ph. Ch. 60. 1909.

Das Ammoniumbiurat krystallisiert ebenfalls ohne Wasser<sup>1)</sup>, seine Krystalle gehören dem rhombischen System an<sup>2)</sup>. Es ist in konzentrierten Ammonsalzlösungen unlöslich (Chlorid<sup>3)</sup>, Sulfat<sup>4)</sup>, Acetat<sup>5)</sup>).

Harnsaures Alkali wird durch Chlorammon gefällt (Liebig und Wöhler), und zwar als saures Ammonurat. Dieses Salz bildet sich immer, wenn Harnsäure in alkalischer Lösung (in Alkalihydrat, einfach saurem Phosphat) und ein Ammonsalz aufeinander treffen. Es ist nach Hopkins in gesättigter Chlorammonlösung völlig unlöslich, löst sich nach Fokker auch nicht in Harnstofflösung, aber in verdünntem Harn. Ammoniak (Schultens) sowie Ammonsalze (Wetzlar) fällen die Harnsäure aus Harn in einigen Stunden so vollständig, dass eine Säure darauf keinen Niederschlag mehr gibt; dagegen scheidet sich aus Harn, aus welchem die Harnsäure mit Salzsäure gefällt ist, auf Zusatz von Ammoniak noch Harnsäure ab (Schwanert). Sättigt man Harn mit Chlorammon, so fällt alle Harnsäure binnen zwei Stunden als saures Urat aus (Hopkins). Diese Ausscheidung erfolgt auch beim Sättigen des Harns mit Ammonsulfat, der Niederschlag tritt aber langsam auf und ist erst nach einigen Tagen vollständig; dieser Niederschlag ist ziegelrot und amorph (Edmunds<sup>6)</sup>).

Einige organische Basen bilden mit der Harnsäure leicht lösliche Salze und besitzen daher ein grosses Lösungsvermögen für die Harnsäure. Nach Rüdel<sup>7)</sup> löst sich 1 g Harnsäure in 1890 cem 2proz. Harnstofflösung. — Piperazin (Diäthylendiamin)  $\text{HN}(\text{C}_2\text{H}_4)_2\text{NH}$ , welches selbst mit einem grösseren Überschuss an Harnsäure immer das neutrale Salz  $\text{C}_4\text{H}_{10}\text{N}_2 \cdot \text{C}_5\text{H}_4\text{N}_4\text{O}_3$  bildet, löst nach Majert und Schmidt die Harnsäure sehr leicht und schon in der Kälte; 1 Teil des Salzes löst sich bei 17° in ungefähr 50 Teilen Wasser. Nach v. d. Klip löst Piperazin bei 16—36° ungefähr eben so viel Harnsäure, wie kohlsaures Lithion, nach Plugge aber besitzt Piperazin in konzentrierter Lösung für Harnsäure ein grösseres Lösungsvermögen als Lithioncarbonat, in grosser Verdünnung dagegen ein geringeres. In einer 10proz. Piperazinlösung ist harnsaures Piperazin nicht unlöslich (Salkowski). Wie Meisels angibt, übt ein Harn mit 2 % und mehr Piperazin auf Harnsäure und Uratkonglomerate keine lösende Wirkung aus. — Auch das weinsaure Dimethylpiperazin (Lycetol) wird von Wittzack als ein Harnsäure lösendes Mittel bezeichnet. — Das harnsaure Methylglyoxalidin (Lysidin)  $\text{C}_4\text{H}_8\text{N}_2 \cdot \text{C}_5\text{H}_4\text{N}_4\text{O}_3$  löst sich nach Ladenburg<sup>8)</sup> schon in sechs Teilen Wasser.

<sup>1)</sup> Gudzent, l. c.

<sup>2)</sup> Gudzent und Tannhäuser, l. c.

<sup>3)</sup> Hopkins, Proc. roy. soc. 52. 93. 1892.

<sup>4)</sup> Edmunds, Am. Journ. of phys. 17. 452. 1895. — O. Folin, Zeitschr. f. ph. Ch. 24. 242. 1897. — E. Wörner, ebenda. 29. 72. 1899. — Folin u. Shaffer, ebenda. 32. 557. 1901.

<sup>5)</sup> Folin, ebenda. 24. 232, 242. 1897.

<sup>6)</sup> Liebig und Wöhler, Ann. d. Ch. u. Pharm. 26. 342. 1838. — F. Gowland Hopkins, Proceedings of the roy. Soc. 52. 93. 1893; Journ. of Pathology and Bacteriology June 1893; Chem. Zentralbl. 192. 2. 8269. — Fokker, Pflügers Archiv 10. 155 u. 161. — A. Edmunds, Journ. of Physiol. 17. 452. 1895. — Schultens, Gehlens Neues Journ. d. Chem. 3. 347. 1804. — G. Wetzlar, Beiträge zur Kenntnis des menschlichen Harns, Frankfurt a. M. 1821. 19.

<sup>7)</sup> Horbaczewski, Zeitschr. f. physiol. Ch. 18. 347. 1893. — Salkowski, Virchows Archiv 50. 193. 1870; Zentralbl. f. d. med. Wissensch. 1894. 515. — G. Rüdel, Arch. f. exper. Pathol. 30. 469. 1892.

<sup>8)</sup> W. Majert u. A. Schmidt, Ber. d. chem. Gesellsch. 23. 3722. 1890. — R. v. d. Klip, Tijdschr. v. Geneesk. 1892. 1. 445; Jahresb. f. Tierch. 1892. 531. — P. C. Plugge, Niederl. Tijdschr. voor Pharmazie 6. 355. 1894; Ch. Zentralbl. 1895. 1. 293. — Salkowski, Pflügers Archiv 56. 349. 1894. — W. A. Meisels, Ungar. Arch. f. Med. 1. 364; Jahresb. f. Tierch. 1893. 582. — H. Wittzack, Allgem. med. Zentralztg. 7. 1894; Jahresb. f. Tierch. 1894. 634. — A. Ladenburg, Ber. d. chem. Gesellsch. 27. 2952. 1894.



Die Löslichkeit der Urate einiger organischer Basen in 100 Teilen Wasser gibt Vicario (l. c.) wie folgt an:

	b. 18°	b. 37°
Propylamin . . . . .	0,285	0,426
Äthylendiamin . . . . .	0,520	0,705
Diäthylendiamin (Piperazin) . . . . .	2,223	2,227
Methylglyoxalidin (Lysidin) . . . . .	4,195	5,663
Dimethylpiperazin . . . . .	5,370	6,086
Urotropin . . . . .	0,633	2,20

Leicht löslich ist auch das Piperidinsalz <sup>1)</sup>.

Über das Verhalten von Pyridin vgl. W. Bräutigam, Pharm. Zeitschr. 47. 1902.

Mit Kreatinin verbindet sich Harnsäure äquimolekular, es handelt sich also um ein primäres Salz <sup>2)</sup>.

Lösungen von Harnsäure (als Natronsalz) in Harnstofflösungen von 6 % und darüber scheiden nach Rüdel (l. c.) auf Zusatz von Säure keine Harnsäure ab, sondern eine Verbindung von Harnsäure mit Harnstoff als flockigen, sich gut absetzenden und sich erst bei 70—80° wieder lösenden Niederschlag. Säuert man die alkalische Lösung an, so besteht die Verbindung aus  $\text{CH}_4\text{N}_2\text{O} \cdot \text{C}_5\text{H}_4\text{N}_4\text{O}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , neutralisiert man nur, so fällt  $2\text{CH}_4\text{N}_2\text{O} \cdot \text{C}_5\text{H}_4\text{N}_4\text{O}_3 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  aus. Für die Bildung des sauren Salzes muss die Lösung mindestens 6 % Harnstoff enthalten, für die des neutralen Salzes ist eine 10proz. Harnstofflösung erforderlich. Beide Verbindungen sind weiss, flockig, ballen sich zu Fetzen und Häuten zusammen, zeigen unter dem Mikroskop Andeutungen von Kugeln und Zylindern und bilden auf dem Filter ein mattglänzendes Häutchen. Wasser und Alkohol zersetzt die Verbindungen, Alkalien lösen sie leicht, verdünnte Salzsäure verändert sie nicht, verdünnte Salpetersäure scheidet salpetersauren Harnstoff ab, konzentrierte Salpetersäure zerlegt sie unter Gasentwicklung.

Das Calciumbiurat löst sich nach Allan und Bensch <sup>3)</sup> in 603 Teilen kalten und 276 Teilen heissen Wassers; wäre also in der Kälte löslicher als das Natriumbiurat. Das neutrale Calciumurat ist viel weniger löslich.

Das Magnesiumbiurat krystallisiert mit  $3\text{H}_2\text{O}$ . Man erhält es leicht gut krystallisiert, wenn man reinste Harnsäure mit überschüssigem Magnesiumoxyd und Wasser zum Sieden erhitzt und das Filtrat erkalten lässt <sup>4)</sup>. Im allgemeinen werden die Biurate der alkalischen Erden durch Umsetzung der betreffenden Salze mit Alkalibiurat erhalten (Bensch, l. c.). Es löst sich nach Allan und Bensch (l. c.) in 3750 Teilen kalten und 160 Teilen kochenden Wassers.

Das saure Bariumsalz ist unlöslich. Die Harnsäure wird aus neutralen Lösungen durch Chlorbarium vollständig gefällt <sup>5)</sup>.

Das Strontiumbiurat löst sich nach Allan und Bensch (l. c.) in 5300 Teilen kalten und 2300 Teilen kochenden Wassers.

Die Urate lassen sich infolge ihrer Zersetzlichkeit in der Wärme meist nicht in der gewöhnlichen Weise umkrystallisieren. Man wird zur Darstellung der krystallisierten Salze der Harnsäure in ähnlicher Weise vorgehen müssen, wie es oben für das Natriumbiurat beschrieben worden ist. Sie sind weder in Lösung, noch im festen Zustande beständig, sondern zersetzen sich. Sie gehen ziemlich rasch durch tierische Membranen, besser aus salzhaltigen Lösungen. Nicht-elektrolyte hemmen die Dialyse nicht, wohl aber Kolloide <sup>6)</sup>. Die Löslichkeit

<sup>1)</sup> Tunnicliffe, C. f. Phys. 11. 434. 1897.

<sup>2)</sup> G. Klemperer, Fortschr. d. Med. 1901. 328.

<sup>3)</sup> Ann. d. Ch. u. Ph. 65. 149. 1848.

<sup>4)</sup> v. Knaffl und Wiechowski, Zeitschr. f. ph. Ch. 77. 303. 1912.

<sup>5)</sup> Geelmuyden, J. I. 22. 198.

<sup>6)</sup> H. Lévine, Diss. Lyon. 1905/06. J. T. 36.



der Biurate wird naturgemäss durch die Anwesenheit von Salzen, welche das gleiche Anion enthalten, erheblich herabgesetzt infolge der Zurückdrängung der Dissoziation. Bei dem Natriumgehalt des Blutes beträgt die Löslichkeitserniedrigung der Laktamform des Natriumbiurats 91,35% der Laktimform 94,1% (Gudzent<sup>1)</sup>).

Aber auch durch Zusatz von Salzen mit einem anderen Kation wird die Löslichkeit der Biurate herabgedrückt, wenn das hinzugefügte Kation mit der Harnsäure ein schwerer lösliches Salz bildet. Es fällt allemal das schwerer lösliche Salz aus. Zusatz von Kochsalz zu einer Lithiumbiuratlösung fällt Natriumbiurat aus, ebenso fällt Kochsalz aus einer Lösung von Harnsäure in Piperazin oder einer anderen organischen Base Natriumbiurat aus. In gleicher Weise wirkt der Zusatz von Ammonsalzen (s. o.). Dementsprechend kann die Zugabe von Lithiumsalz die Löslichkeit des Natriumbiurats in Wasser nicht verbessern. Dagegen berichten Bechhold und Ziegler (l. c.) über eine Verbesserung der Uratlöslichkeit im Serum durch K, Li, Mg-Salze und Ra-Emanation. Unwahrscheinlich mutet dabei die Angabe von Vindevogel (S. 1024) an, dass Kochsalz eine Lösung von Harnsäure in Pottaschelösung oder Harnstoff nicht fälle. Aus dem genannten Grunde wirken die in vitro die Harnsäure leicht lösenden Basen in kochsalzhaltigen Medien wie der Harn weit weniger oder gar nicht (s. w. u.).

Beide Bleisalze sind unlöslich.

Neutrale harnsaure Salze geben selbst in grosser Verdünnung mit Quecksilberchlorid sofort einen weissen Niederschlag wie die anderen Purinstoffe. Dasselbe gilt von anderen Quecksilbersalzen, wie dem Nitrat und Acetat.

Eine verdünnte schwach ammoniakalische Harnsäurelösung (mit neutralem Urat) bleibt auf Zusatz einer ammoniakalischen Silberlösung klar; fügt man der Mischung aber ein Neutralsalz oder eine ammoniakalische Magnesialösung in Salmiak hinzu, so entsteht sofort ein leichter grossflockiger oder gelatinöser Niederschlag (ein Salz der Harnsäure mit Silber und der zweiten als Salz zugesetzten Basis), der sich nach einiger Zeit absetzt, schmutzig weiss oder gelblich erscheint und fast alle Harnsäure enthält (Maly). Nach Schröder lässt sich noch 1 mg Harnsäure aus 200 ccm Wasser als Silber-Magnesia-Salz abscheiden. — Pepton und Propepton beeinträchtigen nach Stadthagen diese Fällung der Harnsäure nicht. — Fällt man Harnsäure in Gegenwart von Magnesiumsalz mit ammoniakalischer Silberlösung, so enthält der Niederschlag auf 1 Mol. Harnsäure 1 At. Silber (Haycraft, Herrmann, Czapek<sup>2</sup>).

Wie die Xanthinbasen gibt auch die Harnsäure mit Kupferoxydul eine so gut wie unlösliche Verbindung. Sie entsteht als weisser feiner, an der Luft grünlich werdender Niederschlag beim Kochen von Harnsäure mit Fehlingscher Lösung wobei das Kupferoxyd durch die Harnsäure selbst zu Oxydul reduziert wird, oder wenn Harnsäure in alkalischer Lösung mit einer Kupferoxydulösung in anderer Weise zusammentrifft. (Reduktion der Fehlingschen Lösung durch Traubenzucker, durch Hydroxylaminsalz, Balke, oder von Kupfersulfat durch Bisulfit, Krüger). In der Wärme entsteht der Niederschlag sofort. Mit Kupfersulfat und Natriumhyposulfit gibt dagegen eine Harnsäurelösung nach Krüger<sup>3</sup>) weder in der Kälte noch in der Wärme einen Niederschlag; die Bildung von harnsaurem Kupferoxydul in Fehlingscher Lösung wird durch Thiosulfat etwas beschleunigt, durch Bisulfit dagegen sofort hervorgerufen.

Sowohl die Fällung durch ammoniakalische Silberlösung und Magnesiainmischung als die durch Kupfersulfat und Bisulfit, werden durch Nucleinsäure und

<sup>1)</sup> Zeitschr. f. ph. Ch. 63. 1909.

<sup>2)</sup> Maly, Pflügers Archiv 6. 203. — v. Schröder, Beiträge zur Physiologie. C. Ludwig gewidmet 1887. 92. — Stadthagen, Virchows Archiv 109. 398. — J. B. Haycraft, Zeitschr. f. anal. Ch. 25. 168. — Aug. Herrmann, Zeitschr. f. physiol. Ch. 12. 500. — F. Czapek, daselbst 508.

<sup>3)</sup> P. Balke, Journ. f. prakt. Ch. [2] 47. 546. — M. Krüger, Zeitschr. f. physiol. Ch. 18. 354.

Thyminsäure gehemmt oder verhindert <sup>1)</sup>. Wahrscheinlich sind auch andere Stoffe in dieser Richtung wirksam (Albumosen etc.).

Nach Balke kommt der Verbindung die Zusammensetzung  $C_5H_4N_4O_3 \cdot Cu_2O$  zu. Sie löst sich nach Krüger <sup>2)</sup> erst in 360 000 Teilen Wasser. Alkalihydrate zersetzen sie nicht, aber in Thiosulfat ist sie nach Krüger löslich. Schwefelalkalien zerlegen sie unter Bildung des der Basis entsprechenden Urats.

Harnsäure gibt nach Kreidl <sup>3)</sup> mit Nessler'schem Reagens einen dem Gewicht der Säure proportionalen Niederschlag.

#### b) Mit Säuren.

Harnsäure löst sich ziemlich leicht in warmer konzentrierter Schwefelsäure (Wetzlar) und beim Erkalten der Lösung krystallisiert schwefelsaure Harnsäure aus. Das Salz wird durch Wasser wieder in seine Bestandteile zersetzt (Fritzsche <sup>4)</sup>).

Gaube <sup>5)</sup> nimmt das Bestehen von Doppelsalzen der Harnsäure und Phosphorsäure an (Urophosphate), aber ohne ausreichenden Beweis. Pfeiffer <sup>6)</sup> hat den Versuch gemacht, diese Annahme zu stützen.

Versetzt man die Lösung eines reinen harnsauren Salzes mit Salzsäure und darauf, so lange die Flüssigkeit noch klar ist, mit Phosphorwolframsäure, so entsteht sofort ein hellchokoladebrauner feinkörniger Niederschlag. Harnsäurelösung, aus welcher die Harnsäure durch Salzsäure gefällt ist, liefert mit dem Reagens langsam einen noch ganz deutlichen Niederschlag brauner, würfelähnlicher, rhombischer Krystalle. Die Niederschläge geben die Murexidprobe. Wird gefällte Harnsäure mit saurer Phosphorwolframsäure geschüttelt, so verwandelt sie sich nach und nach in Aggregate der braunen Krystalle (Huppert). Die Fällung der Harnsäure durch Phosphorwolframsäure ist nach Schöndorff <sup>7)</sup> vollständig.

Von der Fällbarkeit der Harnsäure durch Phosphorwolframsäure gilt das, was oben von der Fällbarkeit der Purinstoffe überhaupt durch dieses Reagens gesagt ist. Verdünnt man die konzentrierte Lösung von Natriumurat mit dem gleichen Volumen Wasser, so erzeugt eine 1% ige PWS-Lösung bei Gegenwart von 1% Salzsäure von 1,19 sp. Gew. keine Fällung mehr. Die konzentrierte Uratlösung wird noch gefällt, der Niederschlag ist jedoch schon bei mässiger Wärme (40°) löslich. Vermeidet man daher einen Überschuss von PWS, so kann man Flüssigkeiten, welche Stoffe enthalten, die sehr leicht mit PWS fallen — wie den Harn — ohne einen Verlust an Harnsäure befürchten zu müssen, durch PWS reinigen. Man setzt zu diesem Zwecke zu der Flüssigkeit 1% Salzsäure von 1,19 sp. Gew. oder die äquivalente Menge Schwefelsäure und ermittelt in kleinen Proben von ca. 4 ccm

<sup>1)</sup> M. Goto, Zeitschr. f. physiol. Ch. 30. 473.

<sup>2)</sup> Krüger, a. a. O. 20. 170 u. a. a. O.

<sup>3)</sup> J. Kreidl, Monatsh. f. Ch. 14. 109. 1893.

<sup>4)</sup> G. Wetzlar, Beiträge zur Kenntnis des menschlichen Harns 1821. 67.  
— Fritzsche, Ann. d. Ch. u. Pharm. 28. 332.

<sup>5)</sup> Gaube, C. r. de la Soc. de Biol. [9] 1. 383. 1889 und 2. 404. 1890.

<sup>6)</sup> E. Pfeiffer, Berliner klin. Wochenschr. 40. 41. 1894. 915.

<sup>7)</sup> B. Schöndorff, Pflügers Archiv 62. 29. 1895.

diejenige grösste Menge von 1% PWS, welche man zusetzen kann, ohne dass im Filtrat PWS nachweisbar wird. Als Reagens auf PWS verwendet man irgend ein besonders leicht fällbares Alkaloidsalz (uns hat sich Chininhydrochlorid bewährt, Bass, unveröffentlicht) oder den Harn selbst. Um jeder Möglichkeit einer Fällung von Harnsäure vorzubeugen, kann man unmittelbar nach dem aus dem Ausfall der Vorproben für die Hauptmenge der Flüssigkeit berechneten und erfolgten Zusatz von PWS eine kleine Quantität einer 5%igen Chininhydrochloridlösung hinzufügen. Die Filtration soll sofort vorgenommen werden. Bei Anwesenheit von sehr viel Harnsäure kann man die ganze Prozedur bei gelinder Wärme (40—50°) vornehmen.

Sehr vollständig wird die Harnsäure (aus Harn) nach Jaffé<sup>1)</sup> neben dem Kreatinin durch Pikrinsäure gefällt; das Filtrat gibt mit ammoniakalischer Silberlösung nur eine minimale Trübung.

Bei Anwesenheit von Nucleaten wird eine Uratlösung durch Essigsäure nicht gefällt und Kupferchlorid erzeugt in der Lösung einen Niederschlag, welcher ein konstantes Verhältnis von N:P aufweist<sup>2)</sup>. Die Annahme, dass es sich um eine Verbindung von 1 Mol. Nucleinsäure und 2 Mol. Harnsäure handle, wurde aber widerlegt<sup>3)</sup>.

c) Die Harnsäure vermag Aldehyd anzulagern. Die entstandenen Verbindungen haben durchaus andere Eigenschaften als die Harnsäure. Harnsäure löst sich in käuflichem 40%igem Formaldehyd leicht, insbesondere in der Wärme, beim Erkalten fällt ein krystallisiertes Produkt aus<sup>4)</sup>. Durch Reduktion der erhaltenen Verbindungen durch Zn und HCl gelangt man zu den verschiedenen Methylharnsäuren<sup>5)</sup>, die Anlagerung findet also an den N-Atomen statt. Meist handelt es sich um die Di-Formylverbindung. Es entstehen aber unter Umständen auch Verbindungen mit 1 und 4 Mol.<sup>4)</sup> Formaldehyd. Die Formaldehyd-Harnsäuren werden durch Säuren nicht gefällt, doch wirken Säuren etwas hemmend auf die Entstehung. Die Harnsäure löst sich in Formaldehyd leichter bei Gegenwart von Alkali. Kochsalz ist ohne Einfluss auf die Löslichkeit<sup>6)</sup>. Löst man das Di-Produkt in Schwefelsäure und fällt mit Wasser, so erhält man Anhydroformaldehydharnsäure<sup>7)</sup>. Die Di-Formaldehydharnsäure verhält sich im Organismus anders als Harnsäure<sup>8)</sup>, wird jedoch nach Schittenhelm (Münch. med. Wochenschr. 1912, Nr. 44) vom Hunde wie Harnsäure zu Allantoin oxydiert.

<sup>1)</sup> Jaffé, Ztschr. f. physiol. Ch. **10**. 393. 1886.

<sup>2)</sup> Seo, Arch. f. exp. Path. u. Ph. **57**. 75. 1907.

<sup>3)</sup> Schittenhelm, Zeitschr. f. exp. Path. u. Th. **4**. 1907.

<sup>4)</sup> Weber, Pott und Tollens, B. B. **30**. 2514. 1897.

<sup>5)</sup> Böhringer Söhne Mannheim-Waldhof, Patentbl. **20**. 873. 1899. Ch. Z. 1900. I. 270.

<sup>6)</sup> Vindevogel, Ann. soc. roy. sc. méd. et natur. Bruxelles 9. fasc. **1**. 63. 1900.

<sup>7)</sup> A. Nikolaier, Arch. f. klin. Med. **89**. 168. 1907.

<sup>8)</sup> Minkowski, Deutsche med. Wochenschr. **28**. 499. 1902.



Ebensowie der Formaldehyd bilden andere Aldehyde (Acet-Salicylaldehyd, Vanillin) mit Harnsäure leicht lösliche, säurebeständige Verbindungen <sup>1)</sup>.

Beim Schütteln mit Benzoylchlorid nimmt die Harnsäure kein Benzoyl auf <sup>2)</sup>. Ebenso wenig gibt sie mit Diazobenzolsulfosäure eine Diazoamidoverbindung <sup>3)</sup>.

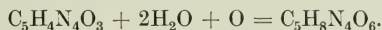
#### 4. Zersetzungen.

a) Wenn man Harnsäure 50 Stunden lang unter Luftabschluss mit Wasser kocht, so entsteht nach Magnier de la Source Dialursäure  $C_4H_4N_2O_4$  und Harnstoff (Kohlensäure und Ammoniak). Wird Harnsäure tagelang mit Wasser auf 150° erhitzt, so bildet sich nach Wöhler harnsaurer Ammon. Aber bei nur vierstündigem Erhitzen von Harnsäure mit einer Lösung der Harnsalze wird nach Cazeneuve und Hugouenq kein Ammoniak gebildet. Bei vierstündigem Kochen mit Magnesia entwickelt die Harnsäure nach Berthelot und André kein Ammoniak; verreibt man dagegen Harnsäure zwei Stunden lang mit 10proz. Salzsäure, so liefert das Filtrat beim Destillieren mit Magnesia 1 % des Stickstoffs der Harnsäure als Ammoniak. Eine siedende Lösung von Kaliumurat beginnt sich nach Kreidl <sup>4)</sup> nach zwölf Stunden zu zersetzen, auch in einer Stickstoffatmosphäre. Mit Wasser von 100° zersetzt sich Harnsäure ebenfalls <sup>4)</sup>. Die dabei auftretenden Produkte verbrauchen mehr Permanganat als die verwendete Harnsäure. In der Kälte tritt erst nach sechs Tagen Zersetzung ein. Diese spontane Zersetzung der Harnsäure in wässriger Lösung wird durch Platin beschleunigt <sup>5)</sup>, durch Mineralsäure verhindert <sup>6)</sup>. Eine wässrige Harnsäurelösung lässt sich nicht ohne merkbare Zersetzung eindampfen <sup>6)</sup>, schon bei einer Temperatur von 18° tritt nach 17 Stunden Zersetzung ein <sup>6)</sup>. Bei der Dialyse geht ein Teil der Harnsäure durch Zersetzung verloren <sup>7)</sup>.

b) Durch Natriumamalgam wird die Harnsäure bei Abschluss der Luft nicht verändert (E. Fischer <sup>8)</sup>).

Beim Erhitzen mit konzentrierter (Jodwasserstoffsäure oder) Salzsäure auf 160—170° zerfällt die Harnsäure in Glycocoll, Kohlensäure und Ammoniak (Strecker <sup>9)</sup>).

c) Die Harnsäure wird in alkalischer Lösung bei Zutritt von Luft zu Uroxansäure oxydiert (Staedeler <sup>10)</sup>):



Die Zersetzung erfolgt ziemlich schnell; nach Nencki und Sieber verschwanden 5 g in 200 ccm 10proz. Kalilauge gelöste Harnsäure bei Bluttemperatur in fünf Tagen. Bei sehr kleinen Harnsäuremengen macht sich nach v. Schröder der Verlust an Harnsäure schon in kürzester Zeit bemerkbar. Eine Lösung von Kaliumurat, welche nur einen geringen Überschuss von Kaliumhydrat oder etwas Natriumcarbonat enthält, erleidet nach Kreidl schon Zersetzung, die Alkaleszenz verschwindet und von da an bleibt die Lösung unverändert; Durchleiten von Luft durch die Flüssigkeit beschleunigt die Zersetzung. Schnell erfolgt die Bildung

<sup>1)</sup> G. Klemperer, Kongress f. inn. Med. 1902. 219.

<sup>2)</sup> v. Udanszky und Baumann, B. B. 21. 2751. 1888.

<sup>3)</sup> R. Burian, Zeitschr. f. ph. Ch. 43. 501. 1905.

<sup>4)</sup> Magnier de la Source, Bull. de la Soc. chim. [2] 23. 483. 1875. — Wöhler, Ann d. Ch. u. Pharm. 103. 118. 1857. — Cazeneuve und Hugouenq, Bull. de la Soc. chim. [2] 48. 82. — Berthelot und André, Bull. de la Soc. chim. [2] 47. 840. — Kreidl, a. a. O. 113.

<sup>5)</sup> Gudzent, Zeitschr. f. ph. Ch. 60. 25. 1900.

<sup>6)</sup> His und Paul, Zeitschr. f. ph. Ch. 31. 65. 1900.

<sup>7)</sup> H. Lévine, Diss. Lyon 1905/06. J. T. 36.

<sup>8)</sup> E. Fischer, Ber. d. chem. Gesellsch. 17. 329. 1884.

<sup>9)</sup> A. Strecker, Ann. d. Ch. u. Pharm. 146. 142. 1868.

<sup>10)</sup> Staedeler, Ann. d. Ch. u. Pharm. 78. 286. 1851.



der Uroxansäure nach Sundwik<sup>1)</sup> beim Behandeln einer alkalischen Harnsäurelösung mit Permanganat in der Kälte.

Bei längere Einwirkung ist jedoch die Zersetzung schon bei 37° und geringer Alkalessenz deutlich<sup>2)</sup>. Eiweisslösungen sollen die Harnsäure gegen den zersetzenden Einfluss der Alkalien schützen<sup>3)</sup>. Auch Piperazin und Schwefelammon wirken zersetzend<sup>4)</sup>, ebenso Ammoniak<sup>5)</sup>, die Wirkung des Ammoniaks wird durch Ammonsalze verhindert.

Entgegen der Annahme von Hirschstein<sup>6)</sup> entsteht bei der Zersetzung der Harnsäure durch Alkali (5 % Lauge in der Kälte) kein Glycocol<sup>7)</sup>.

In Anbetracht dieser Umstände hat man bei Zersetzungsversuchen mit Harnsäure alkalische Lösungen zu vermeiden und womöglich in ausgedämpften Hartglasgefäßen zu arbeiten, um die Wirkung des aus dem weichen Glase in Lösung gehenden Natrons zu umgehen. Man wird immer die Beobachtung machen, dass je reiner das verwendete Urat ist, um so geringer die Zersetzlichkeit ist.

f) In neutraler oder alkalischer Lösung wird die Harnsäure durch Bleisuperoxyd, Braunstein, Ferricyankalium, Kupferoxyd, Quecksilberoxyd, Ozon, Natrium- und Baryumsuperoxyd (Krüger), durch Permanganat die in Wasser suspendierte Harnsäure (Claus), unter bestimmten Umständen auch durch Jod (Bryk<sup>8)</sup>) zu Allantoin oxydiert:



Nach Behrend und Schultz<sup>9)</sup> entsteht bei der Permanganat- oder Luftoxydation der Harnsäure bei alkalischer Reaktion ein Zwischenkörper, der in alkalischer Reaktion zu Uroxansäure, in saurer zu Allantoin führt. Da nach Behrend die Uroxansäure eine Diureidomalonsäure ist, so kann man sich das Zwischenprodukt als Glycolurilcarbonsäure oder als Glycoluriloxycarbonsäure denken, je nachdem man eine einfache Hydrolyse oder eine Hydrolyse mit Oxydation als ersten Akt annimmt. Dieser Zwischenkörper erklärt dann auch die Entstehung von Tetracarbonimid und Carbonyldiharnstoff bei der Oxydation mit Wasserstoffsuperoxyd (s. w. u.). Allantoin erhält man aus Harnsäure quantitativ, wenn man nach E. Sundwik<sup>10)</sup> 100 g Harnsäure in zwei Litern Wasser aufschwemmt, durch Natriumhydroxyd in Lösung bringt und eine kalte konzentrierte Lösung von 62 g Kaliumpermanganat einträgt. Nach einer Stunde ist die Entfärbung beendet, man filtriert dann, säuert mit Essigsäure an und engt zur Krystallisation ein. Schliesslich entsteht bei der Oxydation der Harnsäure in alkalischer Lösung Oxonsäure.

Kocht man eine verdünnte Fehlingsche Lösung nach Zusatz von etwas harnsaurem Alkali, so scheidet sich infolge der Oxydation der Harnsäure durch das Kupferoxyd rotes Kupferoxydul ab, oder, wenn Harnsäure im Überschuss

<sup>1)</sup> Nencki und Sieber, Journ. f. prakt. Ch. [2] 24. 503. 1881. — v. Schröder, a. a. O. 94. — Kreidl, a. a. O. 114. — E. E. Sundwik, Zeitschr. f. physiol. Ch. 20. 335.

<sup>2)</sup> Wiechowski und Wiener, Hofmeisters Beitr. z. ch. Phys. u. Path. 9. 251. 1907.

<sup>3)</sup> Ph. Mitchel, Journ. of biol. Ch. 3. 145. 1907.

<sup>4)</sup> H. Stevens und Clar. E. Mau, Journ. am. ch. soc. 33. 434. 1911. — Folin und Shaffer, Zeitschr. f. ph. Ch. 32. 560. 1903.

<sup>5)</sup> Folin und Shaffer, l. c.

<sup>6)</sup> Zeitschr. f. exp. Path. u. Th. 4. 1907. 118.

<sup>7)</sup> Samuely, ebenda 4. 558. 1907. — Brugsch und Schittenhelm, ebenda 4. 438.

<sup>8)</sup> M. Krüger, Zeitschr. f. physiol. Ch. 21. 313. — Claus, B. B. 7. 227. 1864. — E. Bryk, Monatsh. f. Ch. 15. 519. 1894.

<sup>9)</sup> Ann. d. Ch. u. Ph. 365. 21. 1909.

<sup>10)</sup> Zeitschr. f. ph. Ch. 41. 343. 1904.

vorhanden war, auch ein weisser Niederschlag von harnsaurem Kupferoxydul (Gairdner, Berlin, Böttger, Babo und Meissner, Béhier, Leconte u. a.). — Kupferoxyd-Ammoniak oxydiert die Harnsäure bei Gegenwart von Kali zu Harnstoff und Oxalsäure. Die ammoniakalische Fehlingsche Lösung wird nach Moritz durch 100 g Harnsäure so stark reduziert, wie durch 54,3 g Zucker; das Reduktionsvermögen der Harnsäure ist darnach genau halb so gross wie das des Zuckers, oder, da unter diesen Umständen 1 Mol. Zucker durch 6 Mol. Kupferhydrat oxydiert wird, 1 Mol. Harnsäure wird durch 3 Mol. Sauerstoff oxydiert.

Nach Worm-Müller<sup>1)</sup> kann harnsaures Kali bei genügendem Überschuss an Kaliumhydrat mehr als 2 Mol. Kupferhydrat in Lösung erhalten; es tritt aber bald der weisse Niederschlag von harnsaurem Kupferoxydul auf, um so schneller, je stärker alkalisch die Lösung ist. In der Siedehitze kann 1 Mol. Harnsäure 2 Mol. Kupferoxyd (aus Fehlingscher Lösung) reduzieren. Enthält die Mischung, neben mehr als 0,05 % Harnsäure, bloss die Hälfte dieser Kupferoxydmenge oder weniger, so bleibt das gebildete Kupferoxydul in Lösung oder fällt als harnsaures Salz aus; Lösungen mit weniger als 0,05 % Harnsäure geben mit 1—1,5 Mol.  $\text{Cu}(\text{OH})_2$  auf 1 Mol. Harnsäure am leichtesten einen Kupferoxydulniederschlag, (weil die überschüssige Harnsäure durch das Alkalihydrat zerstört wird). Das harnsaure Kupferoxydul wird durch Kochen mit Lauge nicht verändert, durch Kochen mit Fehlingscher Flüssigkeit aber in rotes Kupferoxydul übergeführt. Wenn das Kupferhydrat bei Überschuss an Alkalihydrat durch die Harnsäure allein gelöst ist, tritt schon in der Kälte Reduktion ein; in der Siedehitze erhält man sie in einer solchen Lösung noch bei 0,016 %, mit Fehlingscher Lösung noch bei 0,006 % Harnsäure; bei 60—70°, wo das Kupferhydrat noch durch Zucker reduziert wird, ist die Reaktion mit Harnsäure sehr schwach. Ist eine zur vollen Oxydation der Harnsäure nicht genügende Menge Kupferoxyd zugegen, so sind die gebildeten Zersetzungsprodukte der Harnsäure imstande, mehr als die bei der Reaktion gebildete Menge Kupferoxydul in Lösung zu erhalten. — Die richtig angestellte Probe zeigt noch 0,35 mg Harnsäure in 5 ccm Lösung durch einen deutlichen Kupferoxydulniederschlag an.

g) Eine Lösung von Wolframsäure in überschüssiger Lauge färbt sich nach Maschke mit Harnsäure grün oder blau und entfärbt sich beim Schütteln mit Luft wieder. Dieselbe Reduktion tritt nach Offer<sup>2)</sup> ein bei Verwendung von Phosphormolybdänsäure; einigermassen konzentrierte Harnsäurelösungen scheiden das gebildete molybdänsaure Molybdänoxid sofort in mikroskopischen tiefblauen sechsseitigen Prismen ab. Auch Phosphorwolframsäure wird bei alkalischer Reaktion von Harnsäure unter Blaufärbung reduziert<sup>3)</sup>.

h) Eine Harnsäurelösung, welche überschüssiges Natron oder Kali enthält, reduziert (bei Anwesenheit von Ammonsalz) salpetersaures Silberoxyd sehr leicht. Auch kohlenensaures Silber wird durch Harnsäure oder harnsaures Alkali durch Reduktion des Silberoxyds sofort geschwärzt (H. Schiff). Nach Mizerskis<sup>4)</sup> Bestimmung scheiden 0,380 g Harnsäure aus ammoniakalischer Silberlösung 1 g metallisches Silber ab, das wäre auf 1 Mol. Harnsäure 4,09 At. Silber.

Eine reine Lösung von Natriumbiurat in Wasser lässt auf Zusatz von ammoniakalischer Silberlösung in kürzester Zeit einen schwarzen Niederschlag ausfallen und wird noch in äusserster Verdünnung braun gefärbt.

i) Beim Kochen von Harnsäure oder harnsaurem Kali mit Eisenchlorid wird das Eisenoxysalz zu Oxydulsalz reduziert und entstehen Harnstoff und Oxalsäure<sup>5)</sup>.

<sup>1)</sup> Worm-Müller, Pflügers Archiv 27. 22. 1882.

<sup>2)</sup> F. Moritz, Archiv f. klin. Med. 46. 242 u. 225. 1890. — O. Maschke, Zeitschr. f. anal. Ch. 16. 425. 1877. — Th. R. Offer, Zentralbl. f. Physiol. 8. 801. 1895.

<sup>3)</sup> H. Moreigne, Ann. ch. analyt. appl. 10. 15. 1905. — C. Frabot, Repert. Pharm. 6. 481. 1904. — Cervello, Arch. f. exp. Path. u. Pharm. 61. 434. 1909.

<sup>4)</sup> H. Schiff, Ann. d. Ch. und Pharm. 109. 67. — A. Mizerski, Nowiny lekarskie 3. 1893. 121; Jahresb. f. Tierch. 1893. 251.

<sup>5)</sup> Salkowski, Pflügers Archiv 2. 958.

j) Ferrisulfat zersetzt eine Harnsäurelösung im Lichte in wenigen Tagen beträchtlich <sup>1)</sup>.

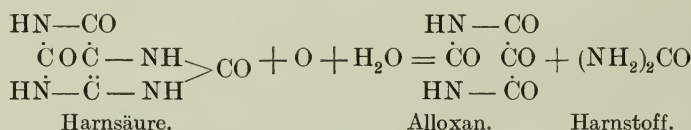
k) Das Licht wirkt an sich auf reine Lösungen von krystallisiertem Natriumbiurat zersetzend, sehr beschleunigt wird diese Zersetzung durch Anwesenheit von Eosin <sup>2)</sup>.

l) Durch Wasserstoffsuperoxyd entsteht in alkalischer Lösung bei Wasserbadwärme aus Harnsäure Tetracarbonimid <sup>3)</sup> und Carbonyldiharnstoff <sup>4)</sup>, durch Ammoniumpersulfat: Allantursäure, Ammoniak, Harnstoff und Glycocoll <sup>5)</sup>.

m) Kreidl <sup>6)</sup> hat ermittelt, wie viel Jod von der Harnsäure in alkalischer Lösung verbraucht wird; die Harnsäure wurde in einem mässigen Überschuss von Normalkalilauge gelöst, mit einem ziemlich bedeutenden Überschuss von  $\frac{1}{30}$  Normal-Jodlösung versetzt, mit Salzsäure übersättigt und das Jod mit Thiosulfat zurücktitriert. Wurde sofort zurücktitriert, so verbrauchte ein Mol. Harnsäure 3,5 At. Jod, nachdem aber das Jod auf die Harnsäure  $\frac{3}{4}$  Stunden eingewirkt hatte, nur 2,3 At. Jod. Nach Ausfällen mit Chlorbarium soll die Harnsäure die einzige Substanz des Harns sein, welche Jod bindet <sup>7)</sup>. Die Harnsäure reduziert auch Jodsäure <sup>8)</sup>. Nach dem Wegkochen des freigewordenen Jods kann man die überschüssige Jodsäure mit Jodkalium zerlegen und durch Jodtitration mit Thiosulfat bestimmen.

n) Die von Gudzent behauptete Zersetzung der Harnsäure durch Radium-Emanation <sup>9)</sup> besteht nicht <sup>10)</sup>.

o) Bei vorsichtiger Oxydation in saurer Lösung (durch kalte konzentrierte Salpetersäure, durch Chlor, Brom, Jod, durch Braunstein und Schwefelsäure), zerfällt die Harnsäure zu Alloxan und Harnstoff.



In der Wärme oxydiert sich das Alloxan weiter zu Parabansäure  $\text{CO} < \begin{array}{c} \text{HN}-\text{CO} \\ \text{HN}-\dot{\text{C}}\text{O} \end{array}$  und  $\text{CO}_2$ ; bei der Einwirkung von Alkalien geht die Parabansäure unter Wasseraufnahme in Oxalursäure  $\text{CO}-\text{NH}\cdot\text{CO}\cdot\text{NH}_2$  über, und diese kann weiter in Oxalsäure und Harnstoff zerfallen.

p) Versetzt man eine Lösung von Harnsäure in verdünnter Schwefelsäure (die mit Schwefelsäure übersättigte Lösung eines Urats) nach und nach mit verdünnter Permanganatlösung, so verschwindet anfangs

<sup>1)</sup> Neuberg, Bioch. Zeitschr. **29**. 290. 1910.

<sup>2)</sup> von Knaflf und Wiechowski, Zeitschr. f. ph. Ch. **77**. 323. 1912.

<sup>3)</sup> Scholz, B. B. **34**. 4130.

<sup>4)</sup> Schittenhelm und Wiener, Zeitschr. f. ph. Ch. **62**. 100. 1909.

<sup>5)</sup> Hugouneng, C. r. ac. **132**. 91. 1901.

<sup>6)</sup> J. Kreidl, a. a. O. 109.

<sup>7)</sup> Pariete de la Cruz, Münch. med. Wochenschr. 1910. 1029.

<sup>8)</sup> E. Riegler, Wiener med. Bl. **26**. 1903. 267.

<sup>9)</sup> Zeitschr. f. ärztl. Fortbildung **8**. Nr. 7. 1911; Therapie d. Gegenw. Dez. 1910; Med. Kl. 1910. Nr. 42. — Mezernitzki, C. r. ac. des sc. **154**. 770. 1909. — Le Radium.

<sup>10)</sup> v. Knaflf und Wiechowski, Zeitschr. f. physiol. Ch. **77**. 303. 1912. — Lazarus und Korb, ebenda.



die Färbung des Permanganats augenblicklich, zuletzt tritt aber ein Punkt ein, bei welchem die Flüssigkeit rot wird, wenn auch nur auf ganz kurze Zeit. Blarez und Denigès<sup>1)</sup> haben ermittelt, dass die Menge Chamäleon, welche von einer bestimmten Menge Harnsäure verbraucht wird, in geringem Grade abhängt von dem Gehalt der Flüssigkeit an Schwefelsäure, wesentlich aber von der Konzentration der Harnsäurelösung; dieselbe Menge Harnsäure verbraucht in konzentrierter Lösung erheblich mehr Permanganat als in verdünnter. Konstant werden die Resultate, wenn nicht mehr als 0,1 g Harnsäure in 800 ccm Flüssigkeit gelöst ist; der Gehalt der Mischung an Schwefelsäure soll ungefähr 3,5 g (2 ccm konzentrierte Schwefelsäure auf 800 ccm) betragen. Die Temperatur ist ohne Einfluss auf die Reaktion. Unter diesen Bedingungen werden 7,4 mg Harnsäure durch 1 ccm  $\frac{1}{10}$  normal Chamäleon zerstört (auf 1 Mol. Harnsäure 1,135 At. Sauerstoff), wobei die für die Endreaktion verbrauchte Chamäleonmenge nicht mitgerechnet ist.

Hopkins<sup>2)</sup> löste aus dem Harn gefällte Harnsäure (20–80 mg) in wenig Natriumcarbonat, füllte mit Wasser auf 100 ccm auf, setzte 20 ccm konzentrierte Schwefelsäure zu und titrierte mit Permanganat. Die Titrierung stimmte zu der Wägung unter der Annahme, dass 1 ccm  $\frac{1}{10}$  normal Chamäleon 7,5 mg Harnsäure anzeigt. Bei Versuchen mit reiner Harnsäure hat Huppert gefunden, dass unter denselben Umständen durch 1 ccm der Chamäleonlösung nur 7,22 mg Harnsäure oxydiert werden. Die Chamäleonlösung war auf Eisen gestellt, Hopkins hat die seine durch Wägung des Permanganats bereitet.

Durch Permanganat in saurer Lösung soll die Harnsäure quantitativ zu Harnstoff oxydiert werden (Jolles<sup>3)</sup>). Dies wird von Falta bestritten<sup>4)</sup>.

q) Löst man Harnsäure in Salpetersäure oder Chlorwasser in der Wärme und verdunstet man die Lösung vorsichtig zur Trockene, so bleibt ein roter Rückstand, der dann auf Zusatz von Ammoniak schön purpurrot (purpursaures Ammon, Murexid), durch (nachträglichen) Zusatz von Kali- oder Natronlauge aber schön rötlich blau wird.

Man kann über freiem Feuer abdampfen, schöner fällt die Probe jedoch aus, wenn man im Wasserbade mit verdünnter Säure verdunstet, und den Verdampfungsrückstand neben Ammoniak unter eine Glocke stellt. Man verwende nur wenig Harnsäure. — Ist der Abdampfungsrückstand nur zitronengelb und nicht rot, so gibt er mit den Alkalien die Färbungen nicht, es hat dann an Salpetersäure gefehlt. Man übergiesst den Rückstand nochmals mit Salpetersäure und dampft wieder zur Trockne ein.

Eine Lösung von purpursauerm Ammon weist nach Krukenberg<sup>5)</sup> einen Absorptionsstreifen zwischen E u. F, eine solche von purpursauerm Natron einen Streifen zwischen D und b auf.

Die Murexidprobe kommt in folgender Weise zustande. Bei der Oxydation der Harnsäure mit verdünnter Salpetersäure (oder mit Chlorwasser) entsteht Alloxantin, welches als eine Verbindung von Alloxan mit Dialursäure  $\text{CO} < \begin{smallmatrix} \text{HN} - \text{CO} \\ \text{HN} - \text{CO} \end{smallmatrix} > \text{CH} \cdot \text{OH}$  aufgefasst werden kann. Ammoniak führt die Dialursäure in Dialuramid

<sup>1)</sup> Ch. Blarez u. G. Denigès, Comptes rendus 104. 789. 1887.

<sup>2)</sup> F. Gowland Hopkins, Journ. of Pathol. and Bacteriol. June 1893. 451.

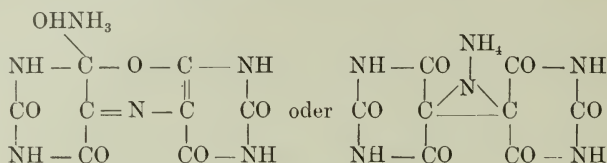
<sup>3)</sup> Zeitschr. f. ph. Ch. 29. 239. 1900; B. B. 34. 3787. 1901.

<sup>4)</sup> B. B. 34. S. 2674, 3786, 1901.

<sup>5)</sup> Krukenberg, Verhandl. der physik. med. Gesellsch. zu Würzburg, N. F. 18. 199. 1884.

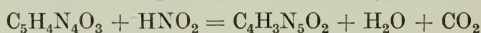


$\text{CO} < \begin{smallmatrix} \text{HN} - \text{CO} \\ \text{HN} - \text{CO} \end{smallmatrix} > \text{CH} \cdot \text{NH}_2$  (Amidobarbitursäure, Uramil, Murexan) über. Die Purpursäure ist aber eine Verbindung von Alloxan und Dialuramid.



Die freie Purpursäure zerfällt mit Wasser sofort in Dialuramid und Alloxan. Weitere Literatur über das Murexid ist unten angegeben <sup>1)</sup>.

r) Harnsäure gibt mit salpetriger Säure Stryphninsäure (Gibbs)



oder Urinylsäure (und Glykolsäure) (Sokoloff)



s) Mit verdünnter roter rauchender Salpetersäure entwickelt Harnsäure nach Heinrich  $\frac{1}{4}$  ihres Stickstoffs; mit salpetrigsaurem Kali und konzentrierter Essigsäure nach Emmerling in der Kälte so gut wie nichts, in der Wärme ungefähr  $\frac{1}{3}$  ihres Stickstoffs; mit salpetrigsaurem Kali und verdünnter Schwefelsäure in der Wärme nach Kreusler <sup>2)</sup> 39,3 % ihres Stickstoffs.

t) Bei längerer Einwirkung von unterbromigsaurem Natron auf Harnsäure gibt sie nach Hüfner 47,1, nach Falck <sup>3)</sup> 47,8 % ihres Stickstoffs als Gas ab.

Bromhaltige Lösung von unterchlorigsaurem Natron nimmt mit Harnsäure eine intensiv rosenrote Färbung an, die nach einiger Zeit verschwindet (Dietrich <sup>4)</sup>).

u) Bei 4 stünd. Erhitzen von Harnsäure mit Phosphorsäure auf 150° treten nach Schöndorff <sup>5)</sup> 14,8 % Stickstoff, bei 230° 31,6 % als Ammoniak auf; sie enthält 33,3 % Stickstoff. Bei vierstünd. Erhitzen mit alkalischer Chlorbaryumlösung auf 230° liefert sie 3 Mol. Kohlensäure, gibt aber den Stickstoff nur unvollständig ab.

v) Beim Verbrennen der Harnsäure oder ihrer Salze entwickelt sich Blausäure.

w) Durch Chromsäure wird Harnsäure zu Harnstoff oxydiert <sup>6)</sup>.

x) Beim Erhitzen mit Calciumformiat und Calciumhydroxyd im Rohre bis zur beginnenden Gasentwicklung wird Harnsäure nach E. Sundwick zu Xanthin reduziert <sup>7)</sup>.

<sup>1)</sup> Liebig u. Wöhler, Ann. d. Ch. u. Ph. **26**. 254. 267, 319. 1838. — Fritzsche, ebenda **32**. 316. 1839. — Gregor, ebenda **33**. 334. 1840. — Beilstein, ebenda **107**. 158. 1858. — Piloty u. Finckh, ebenda **333**. 22. 1904. — Möhlau u. Sitter, Journ. f. pr. Ch. **73**. 449. 1906.

<sup>2)</sup> F. Heinrich, Sachsses Phytochemische Untersuchungen **1**. 101. — A. Emmerling, Landwirtschaftl. Versuchsstation. **32**. 447. — U. Kreusler, das. **31**. 309.

<sup>3)</sup> Hüfner, Journ. f. prakt. Ch. [2] **3**. 21. — Falck, Pflügers Archiv **26**. 406.

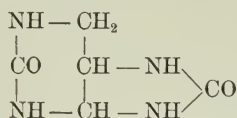
<sup>4)</sup> Dietrich, Zeitschr. f. anal. Chem. **4**. 176.

<sup>5)</sup> B. Schöndorff, Pflügers Archiv **62**. 29. 1895.

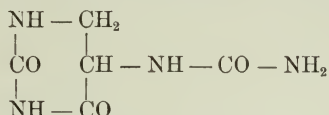
<sup>6)</sup> Tocher, Pharm. Journ. **15**. 161. 1902; Ch. Z. 1902. II. 827.

<sup>7)</sup> Sk. Arch. f. Ph. **25**. 156. 1911. vgl. auch Zeitschr. f. ph. Ch. **23**. 476; **26**. 131.

y) Die elektrolytische Reduktion der Harnsäure führt zu Puron <sup>1)</sup>



oder bei Anwesenheit von starker Schwefelsäure zu Tetrahydroharnsäure <sup>2)</sup>.



z) Die Harnsäure zersetzt sich auch unter der Einwirkung von Mikroorganismen.

Eine wässrige Lösung von freier Harnsäure hält sich nach Kreidl nur in sterilisiertem Zustand und unter Abschluss der Luftkeime; bei Zutritt solcher zersetzt sie sich aber in einigen Tagen. — Nach Fausto und Leone Sestini hält sich in Wasser suspendierte freie Harnsäure unter freiem Zutritt von Luft monatelang unverändert. Versetzt man die Flüssigkeit aber mit einigen Tropfen faulen Harns, so tritt im Sommer schnell Zersetzung ein. *Bacillus* (*Micrococcus*) *ureae* ist dabei besonders tätig, auch *Bacillus fluorescens* scheint nicht ohne Einfluss zu sein. Zu einer schnellen Gärung ist eine höhere Temperatur (25° und darüber) und Lüftung erforderlich. Die Flüssigkeit nimmt von gebildetem Ammoncarbonat alkalische Reaktion an, es scheidet sich Ammonurat ab, zuletzt tritt aber aller Stickstoff der Harnsäure als kohlensaures Ammon auf. Alloxan wurde unter den Zersetzungsprodukten nicht aufgefunden. — Lange vorher hat H. Ranke bereits die Angabe gemacht, dass harnsaurer Natron mit Bierhefe zwar bei 17° nach drei Wochen noch keine Spur von Zersetzung zeigt, bei 32° aber schon nach einigen Tagen in Zersetzung begriffen ist; in der Flüssigkeit liess sich Oxalsäure und Harnstoff nachweisen, und kohlensaures Ammon verflüchtigte sich in reichlicher Menge. Sehr wahrscheinlich waren auch hier die die unreine Hefe begleitenden Bazillen das wirksame. — Gérard <sup>3)</sup> hat ermittelt, dass sich unter den Mikroben (Kokken und Bakterien), welche Harnsäure in Natriumphosphatlösung schon bei gewöhnlicher Temperatur, schneller bei 30—32° zerlegen, solche vorfinden, welche aus der Harnsäure bloß den Harnstoff abspalten, andere, welche den Harnstoff in kohlensaures Ammon überführen. Bei der Zersetzung tritt der ganze Stickstoff der Harnsäure als Harnstoff oder Ammoncarbonat auf; in dem stickstofffreien Spaltungsprodukt vermutet Gérard die Tartronsäure.

Ulpiani <sup>4)</sup> gelang die Reinzüchtung eines *Bacterium acidurici*. Es wächst gut auf Bouillon und Gelatine. Zugesezte Harnsäure wird in wenigen Tagen vergoren, Harnsäurekrystalle verschwinden. Durch die Tätigkeit dieses Bacteriums wird die Harnsäure in zwei Moleküle Harnstoff zerlegt. Die hierbei freiwerdende dreigliederige Kohlenstoffkette wird von den Bakterien unter Kohlensäurebildung verwendet. Die Abspaltung des Harnstoffs stellt nur einen vorbereitenden Akt dar.

<sup>1)</sup> J. Tafel u. Percy Housmann, B. B. 40. 3743. 1907.

<sup>2)</sup> Tafel, B. B. 34. 258. 1901.

<sup>3)</sup> J. Kreidl, a. a. O. 111. — F. u. L. Sestini, Landwirtschaftl. Versuchstationen 38. 157. 1891. — H. Ranke, Journ. f. prakt. Ch. 56. 15. 1852. — E. Gérard, Comptes rendus 122. 1019; 123. 185. 1896.

<sup>4)</sup> Atti della R. ac. dei linc. Roma 12. 236. 1903. — Ulpiani u. Cingolani, Gaz. chim. ital. 34. 377. 1905; Rend della soc. ch. di Roma 1904. 140.

z) 1. Schliesslich wird die Harnsäure durch ein im Säugetierorganismus verbreitetes Ferment (Uricooxydase, Uricase) zerlegt<sup>1)</sup>. Über die Verteilung desselben auf die einzelnen Organe s. S. 927. Die Harnsäure wird durch dieses Ferment quantitativ zu Allantoin oxydiert<sup>2)</sup>. Fettige Degeneration der betreffenden Organe (Leber des Hundes z. B.) infolge von Vergiftungen, beeinträchtigt die Wirksamkeit des Ferments nicht<sup>3)</sup>. Die Organe von hungernden Tieren haben ein kleineres Harnsäureoxydationsvermögen<sup>4)</sup>. Den Organen des Menschen fehlt die Uricooxydase, alle Angaben, dass die menschlichen Organe Harnsäure zu zerstören imstande wären, haben sich als irrtümlich erwiesen<sup>5)</sup>. Insbesondere gilt das auch vom Menschenblut<sup>6)</sup>. Dagegen hat die Leber der Fische (Selachier) ein sehr bedeutendes Harnsäurezerstörungsvermögen<sup>7)</sup>.

Verhalten der Harnsäure im Harn: Aus feurig gelben bis roten sauren Harnen scheidet sich beim Stehen derselben nach der Entleerung häufig ein lehmgelbes bis lebhaft rosenrotes Sediment ab, welches im Anfang den ganzen Harn homogen trübt und sich nur langsam (im Verlauf von Stunden, selbst Tagen) zu Boden setzt. Bei gewissen fieberhaften Affektionen (Pneumonie, Rheumatismus) ist es gewöhnlich; es entsteht aber auch in konzentrierten normalen Harnen (Sedimentum lateritium). Nach purinreichen Mahlzeiten kommt es fast stets vor, ebenso nach Einnahme von Atophan. Doch findet es sich bei wiederholter Einnahme nur nach den ersten Dosis im Harn. Häufig wird der Harn hierbei schon trüb entleert.

Auch solcher Harn, welcher spontan kein Sediment absetzt, liefert beim Abkühlen noch ein Uratsediment, und wo dies nicht der Fall ist, geschieht die Abscheidung noch, wenn man nach Roberts den Harn im Wasserbad auf ein kleines Volumen eindampft, heiss filtriert und das Filtrat in Eis stellt.

Nur aus Eiweiss-harn erhält man nach Zoja<sup>8)</sup> durch Abkühlen kein Uratsediment.

Das aus saurem Harn abgeschiedene Sediment besteht nach Roberts wesentlich aus Quadriurat; nach den Analysen von Heintz, Scherer, sowie Bence Jones kann es alle im Harn vorkommenden anorganischen Basen (Ammoniak, Natron, Kali, Kalk, Magnesia) enthalten. Neben dem Quadriurat tritt häufig auch Kalkoxalat auf. Das Salz zersetzt sich leicht, namentlich in Berührung mit Wasser, in Biurat, welches in Lösung geht, und in Harnsäure, welche in grossen,

<sup>1)</sup> Stokvis, Nederl. Tijdschr. voor Geneeskunde 1858. — Chassevant u. Richet, C. r. soc. biol. 1897. 743. — Ascoli, Pflügers Archiv 72. 340. 1898. — M. Jakoby, Virchows Archiv 157. 235. 1899. — H. Wiener, Arch. f. exp. Path. u. Ph. 42. 375. 1899. — Wiechowski u. Wiener, Hofmeisters Beitr. z. ch. Ph. u. Path. 9. 247. 1907.

<sup>2)</sup> W. Wiechowski, Hofmeisters Beitr. z. ch. Ph. u. Path. 9. 295. 1907. Acroid, Bio-chemical Journ. Vol. V. 217. 1910.

<sup>3)</sup> Gideon Wells, Journ. of exp. Med. 12. 609. 1910.

<sup>4)</sup> Lauder, Bruntton u. Bockenham, Zentralbl. f. Phys. 19. 1. — G. Izar, Zeitschr. f. ph. Ch. 73. 317. 1911.

<sup>5)</sup> W. Wiechowski, Arch. f. exp. Path. u. Ph. 60. 185. 1909. — Batelli u. Stern, Bioch. Zeitschr. 19. 219. 1909. — Miller u. Jones, Zeitschr. f. ph. Ch. 62. 396. 1909. — Gideon Wells u. Corper, Journ. of biol. Ch. 6. 321. 1909. — Schittenhelm, Zeitschr. f. ph. Ch. 63. 248. 1909.

<sup>6)</sup> G. Klemperer, Ther. d. Gegenw. 1901. 344. — Leyden, Festschr. II. 195; Zentralbl. f. inn. Med. 25. 1289. 1904. — Brugsch u. Schittenhelm, Zeitschr. f. exp. Path. u. Ther. 4.

<sup>7)</sup> Scoffidi, Bioch. Z. 18. 506. 1909. 25. 296. 1910.

<sup>8)</sup> Arch. it. di cl. med. 32. 11. 1893.



gefärbten Krystallen zurückbleibt (Bence Jones, Roberts). In ammoniakalischem Harn besteht das Uratsediment aus krystallinischem Ammonbiurat (Taf. II, Fig. 3).

Keineswegs immer fällt die Harnsäure als Quadriurat aus, häufig tritt auch die Harnsäure sogleich frei auf in den beschriebenen Formen. Alle Harne, welche kein Quadriurat absetzen, scheiden freie Harnsäure ab.

Das Uratsediment bildet feine Körnchen, die haufenweise bei einander liegen (Taf. II. Fig. 2). Erfolgt seine Ausscheidung in hydratischer Form, wie beim Harnsäureinfarkt der Neugeborenen, im frischen Vogel- oder Schlangenkot, so bildet es durchscheinende, radiär gestreifte Kugeln. Es löst sich beim Erwärmen des Harns schon unterhalb der Siedetemperatur wieder vollständig auf. Auf Zusatz einer Säure verschwinden die Körnchen und nach einiger Zeit treten an ihre Stelle Krystalle von Harnsäure.

Die Zersetzung desselben durch Wasser unter Abscheidung von Harnsäure lässt sich auch unter dem Mikroskop beobachten. In Berührung mit Wasser liefert es nach Roberts <sup>1)</sup> bald etwas mehr, bald etwas weniger Harnsäure, als der Formel des Quadriurats entspricht, was darin seinen Grund haben soll, dass sich ihm aus saurem Harn Harnsäure, aus minder saurem Biurat amorph beimischen.

In einem Harn, der ein Uratsediment enthält und nachträglich ammoniakalisch geworden ist, kann man das harnsaure Ammon noch neben den Körnchen des Quadriurats und der Harnsäure antreffen.

Das Quadriurat im Harninfarkt der Neugeborenen ist nach Flensburg in eine hyaline Eiweissubstanz, wahrscheinlich mucinähnliche Substanz, eingelagert. — Nur der Vogelharn kommt im unzersetzten Zustande zur Beobachtung, so dass sich die hydratischen Kugeln des Quadriurats leicht wahrnehmen lassen; auch hier begleitet eine schleimige Substanz das Urat. Der Schlangenharn verweilt nach Roberts <sup>2)</sup> 1—7 Wochen im Leibe der Schlangen und kommt daher zersetzt zum Vorschein. Nach einer Untersuchung von Roberts enthielt der Vogelharn Ammoniak und hinterliess 8,68 % Asche, hauptsächlich Kalium und Natrium, eine Spur Eisen, geringe Spuren Calcium, Kieselsäure, Schwefelsäure, Phosphorsäure. Der Schlangenkot reagiert sauer und enthält neben Quadriurat etwas freie Harnsäure; in feuchtem Zustand wird er leicht zu Ammonbiurat. Roberts fand in demselben 82,88 % Harnsäure, 3,33 % Kali, 1,06 % Natron, 1,92 % Ammoniak und 10,83 % Wasser, andere organische Substanz, Eisen, Spuren Kalk. Als Quadriurat waren 80,71 % der Harnsäure vorhanden, als freie 2,09 %.

Ein eigentümliches Sediment, welches vielleicht aus Calciumurat bestand, hat Delepine <sup>3)</sup> manchmal neben Calciumoxalat, auch bei Gicht, beobachtet. Es bildet selbst in heissem Wasser unlösliche, farblose, prismatische Krystalle vom Aussehen des Natriumbiurats, gibt die Murexidreaktion und zersetzt sich mit Salzsäure schwerer als das gewöhnliche Uratsediment. Die Krystalle entstehen auch beim Behandeln von Harnsäure oder Uratsediment mit Kalkwasser oder hartem Wasser.

Nach den Untersuchungen von Tunnicliffe und Kohler bestehen die Quadriurate als Verbindungen nicht (s. o. S. 1016). Man hat es also in den erwähnten Fällen entweder mit der Abscheidung von reiner Harnsäure oder mit der Abscheidung eines Gemisches von Harnsäure und Biurat zu tun. Auch die Uratsteine der Blase und der Nieren

<sup>1)</sup> Sir W. Roberts, On the chemistry and therapeutics of Uric Acid Gravel and Gout. London 1892. 27.

<sup>2)</sup> C. Flensburg, Nord. med. Arkiv, 1894; Jahresb. f. Tierch. 1893. 581. — Roberts, a. a. O. 20.

<sup>3)</sup> S. Delepine, Journ. of Physiol. 8. II. 1887.



sind Gemenge von Biuraten und Harnsäure. Doch kommen auch Konkrementen vor, die nur aus harnsaurem Ammoniak bestehen.

Die Abscheidung der freien Harnsäure aus Harn geht nach Roberts um so früher zu Ende, je früher sie anfängt. Zeigt sich die erste Harnsäure innerhalb 24 Stunden nach der Entleerung, so ist die Abscheidung in einigen Stunden beendet; beginnt sie erst nach einer Woche oder später, so dauert sie einige Tage. Der Harn enthält dann keine durch Salzsäure fällbare Harnsäure mehr. Wie aus den Zahlen von Zerner<sup>1)</sup> hervorgeht, erfolgt die Ausscheidung der freien Harnsäure bei jedem Verhältnis zwischen einfach und zweifach saurem Urat. Sie wird nach Roberts beschleunigt durch einen hohen Gehalt des Harns an Harnsäure, verzögert, wie es scheint, durch die Harnfarbstoffe.

Nach Voit und Hoffmann<sup>2)</sup> nimmt die Acidität des Harns mit dem Ausfallen des Uratsediments ab. Nach denselben Autoren soll sich das Uratsediment in dem Harn, aus welchem es ausgefallen ist, nicht wieder bei Bluttemperatur auflösen. Dieser Angabe stehen neuere Beobachtungen entgegen. Jedenfalls tritt Lösung ein, wenn man den Harn einige Stunden auf 40—45° erwärmt.

Filtrierte man Harn durch ein Filter, auf welchem sich Harnsäure befindet, so kann man ihm, wie Pfeiffer zuerst gezeigt hat, die Harnsäure so weit entziehen, dass Salzsäure keinen Niederschlag mehr gibt. Bei Gicht und bei Steinkrankheit genügt dazu nach Pfeiffer 0,5, selbst nur 0,2 g Harnsäure; bei Gesunden sind 2—3 g erforderlich. Wieviel von der Harnsäure des Harns beim Filtrieren durch Harnsäure ausfällt, hängt nach Roberts<sup>3)</sup> ab von der Acidität des Harns, dem Gehalt des Harns an Harnsäure, der Schnelligkeit des Filtrierens und der Menge des Harns.

Das Auftreten der Harnsäuresedimente hängt mit den besonderen Löslichkeitsverhältnissen der Harnsäure im Harn zusammen. In die Niere gelangt die Harnsäure als Biurat. Im Harn befindet sich die Harnsäure in einer Flüssigkeit von wechselnder, aber meist höherer Acidität als das Blut ist. Von dem wahren Grade dieser Acidität der Dissoziationskonstante der Harnsäure und dem Dissoziationsgrade ihrer Salze wird es abhängen, wie viel Harnsäure als Biurat und wie viel als freie Harnsäure im Harn vorhanden ist. Biurat sowohl als freie Harnsäure werden ausfallen, sobald ihr Löslichkeitsprodukt im Harn überschritten ist. Abgesehen von der Konzentration und Temperatur wird das Ausfallen von Na-Urat durch einen reichlichen Gehalt des Harns an Natriumsalzen, das der freien Harnsäure durch eine hohe Acidität des Harns befördert werden. Die normale Acidität des Harns wird durch das zweifachsaure Natriumphosphat bedingt, welches zwar eine schwächere Säure als Harnsäure ist, aber infolge seiner weitaus grösseren Menge fällend wirken kann. Harnen werden also dann besonders zur Sedimentbildung neigen, wenn sie viel Harnsäure, reichlich Natriumsalze enthalten und sauer sind. Vermindert wird die

<sup>1)</sup> Sir Roberts, a. a. O. 39. — Th. J. Zerner, Wien. klin. Wochenschr. 1893. 272.

<sup>2)</sup> Sitzungsber. d. k. bayr. Akad. d. Wissensch. 1867. 2. 279; Zeitschr. f. anal. Ch. 7. 397.

<sup>3)</sup> E. Pfeiffer, Verhandl. des V. Kongresses f. inn. Med. 1886. 445; des VII. Kongr. 1888. 326; des VIII. Kongr. 1889. 172. — Sir Roberts, Lancet Jan. 4. 1890; Jahresb. f. Tierch. 1891. 403; a. a. O. 43.

Neigung zur Bildung von Uratsedimenten durch einen geringen Gehalt an Harnsäure, viel Harnwasser, wenig Natriumsalze und niedrige Acidität (alkalische Reaktion). Nach dem oben Ausgeführten muss in Uratlösungen immer das jeweils am schwersten lösliche Urat ausfallen. Im normalen, nicht zersetzten Harn wäre das das Magnesiumbicitrat, im zersetzten, ammoniakalischen Harn das Ammonurat. In letzterer Form ist die Harnsäure auch stets im Sedimente solcher Harn vorhanden. Mit diesen Verhältnissen hängt auch die Löslichkeit des Harns für Harnsäure zusammen. Bringt man in einen Harn Harnsäure in Substanz und lässt einige Zeit einwirken, so löst sich entweder ein Teil der zugesetzten Harnsäure oder es fällt aus dem Harn noch Harnsäure aus oder es geschieht nichts. Hindhede<sup>1)</sup> hat in dieser Weise den menschlichen Harn bei verschiedener Ernährung untersucht. Im allgemeinen ging das Lösungsvermögen des Harns für Harnsäure seiner titrierbaren Acidität reziprok, doch kamen gelegentlich erhebliche Ausnahmen vor. Die wahre Acidität wurde nicht bestimmt, so dass man über die Bedeutung der erwähnten Ausnahmen nichts aussagen kann. Am meisten Harnsäure löste der Harn bei reiner Kartoffelkost. Bei ausschliesslicher Brotnahrung oder bei reichlich Fleisch in der Nahrung war das Lösungsvermögen negativ, d. h. bei dem Versuche wurde nicht nur keine Harnsäure gelöst, sondern es fiel sogar solche aus dem Harn aus.

In ähnlicher Weise ist das Verhalten von Substanzen, welche dem Harn zugesetzt werden, auf die Löslichkeit der Harnsäure zu beurteilen. Nach dem, was oben bei der Besprechung der Urate ausgeführt worden ist, müssen alle jene Substanzen, welche im Glase die Harnsäure leicht lösen, indem sie mit ihr leicht lösliche Salze bilden, als solche im Harn wenig wirksam oder unwirksam sein, weil dieser stets Kationen enthält, welche schwerer lösliche Urate bilden. Nach W. Orłowski<sup>2)</sup> lösen 0,5%ige wässrige und 0,5%ige harnige Lösungen der folgenden Substanzen Harnsäure:

100 ccm wässriger Lösung:		100 ccm harnige Lösung:
Uricedin (ein Gemenge pflanzensaurer Alkalien)	0,0266	0,000
Urotropin . . . . .	0,09	0,000
Natriumbikarbonat . . . . .	0,295	es fällt Urat aus
Piperazin . . . . .	0,4934	0,043
Lysidin . . . . .	0,968	0,101

Reichlicher Alkalizusatz wird natürlich die Sedimente in Lösung bringen. Anders ist das Verhalten des Formaldehyds, da dieser sich mit der Harnsäure zu einer leicht löslichen Verbindung addiert. Uratsedimente lösen sich im Harn nach Zugabe von 1—2% Formol, auf Ansäuern erfolgt keine Fällung von Harnsäure<sup>3)</sup>. Im Harn entsteht wahrscheinlich die Monoformylverbindung<sup>4)</sup>.

<sup>1)</sup> Sk. Arch. f. Phys. 26. 384. 1912.

<sup>2)</sup> Przegląd lekarski 39, 239. 1900; Zeitschr. f. klin. Med. 40. 331. 1900.

<sup>3)</sup> Nikolaier, Zeitsch. f. klin. Med. 38 373. 1899.

<sup>4)</sup> Nikolaier, Arch. f. klin. Med. 89. 168. 1907.

Zur Behandlung der harnsauren Diathese, welche durch eine erhöhte Neigung des Harns zur Sediment- und Konkrementbildung innerhalb der Harnwege gekennzeichnet ist, wird man, abgesehen von jenen Massnahmen, welche die Menge der ausgeschiedenen Harnsäure herabsetzen sollen (purinarmer Diät), von den oben erläuterten Löslichkeitsverhältnissen der Harnsäure im Harn geleitet, alle Versuche, die Lösungsfähigkeit des Harns durch Zufuhr von Lithiumsalzen oder organischen Basen zu steigern als ganz zwecklos beiseite lassen und nur dafür sorgen, dass der Harn verdünnt und wenig sauer sei. Das letztere aber durch Zufuhr von vielen Alkalien (kohlen- oder pflanzensauren) zu erzielen, ist deshalb unzweckmässig, weil dadurch der Harn an Kationen sehr reich wird, was allemal seine Lösungsfähigkeit für Urate herabsetzen muss. Da die Acidität des Harns zum grössten Teil durch die Phosphorsäure bedingt ist, wird man das Ziel am besten dadurch erreichen, dass man die Phosphorsäureausscheidung im Harn herabsetzt. Das gelingt leicht durch Einnahme von Calciumcarbonat, welches einen grossen Teil der Phosphorsäure im Darm fixiert und so von der Niere ablenkt. Da ein Teil der zirkulierenden Kalksalze stets in den Darm ausgeschieden wird und die Phosphorsäure immer mit dem Kalk geht, so wird auch das essigsaure Calcium so wirken müssen und einen Teil der zirkulierenden Phosphorsäure von der Niere weg in den Darm leiten, aus welchem es mit dem Kot entfernt wird. In der Tat sinkt die Phosphorsäureausscheidung im Harn nach Gaben von Calciumcarbonat und die Lösungsfähigkeit des Harns für Harnsäure nimmt zu<sup>1)</sup>.

Hierin liegt eine Erklärung der Wirkung erdiger Quellen bei diesen Zuständen. Nach Röse (l. c.) soll schwefelsaurer Kalk ähnlich wirken. Weiter kann man von dem erwähnten Verhalten des Formaldehyds Gebrauch machen. Nach Nikolaier<sup>2)</sup> geht eingenommenes Urotropin in den Harn über und kann durch freiwerdenden Formaldehyd Harnsäure unter Bildung der beschriebenen Formylverbindungen lösen. Dass Mineralwasserkuren anderer Art, im Sinne der auf S. 1009 erwähnten indirekten Beeinflussung auch auf das Lösungsvermögen des Harns für Harnsäure wirken können, ist durchaus denkbar.

Abgesehen von der Lösungsfähigkeit des Harns für Harnsäure, welche aus seinem Gehalt an Salzen und seiner Acidität hervorgeht, welche also im wesentlichen durch ein bestimmtes Elektrolytgleichgewicht<sup>3)</sup> im Harn beherrscht wird, hat der Harn aber noch als solcher die Fähigkeit, die Harnsäure besser zu lösen als Wasser. Nach Zusatz von Salzsäure zu Harn bleibt mehr Harnsäure in Lösung als das Harnwasser lösen kann, auch wenn man den Harn nach His und Paul längere Zeit schüttelt<sup>4)</sup>. Nach Rüdell ist hiefür der Harn-

<sup>1)</sup> v. Noorden, Lehrbuch der Path. d. Stoffwechsels 1893. — v. Noorden-Strauss, 14. Congr. f. inn. Med. Wiesbaden 1896. — J. Strauss, Zeitschr. f. klin. Med. 31. 1897. — G. Herzheimer, Berliner klin. Wochenschr. 1897. Nr. 20. — C. Röse, Veröffentlichungen d. Zentralstelle für Balneologie. H. 9.

<sup>2)</sup> Arch. f. klin. Med. 81. 181. 1905.

<sup>3)</sup> Fr. Mc. Crudden, Journ. am. ch. soc. 26. 280. 1904. Ch. Zeitschr. 1904. II. 1339.

<sup>4)</sup> A. Nikolaier und Dohrn, Deutsches Archiv f. klin. Med. 91. 151. 1907.



stoff verantwortlich zu machen, nach Klemperer das Urochrom<sup>1)</sup>. Eine Lösung von reinem Urochrom löst Harnsäure besser als Wasser. Nach Lichtwitz<sup>2)</sup> spielen Kolloide hierbei eine ausschlaggebende Rolle. Dass die Kolloide die Löslichkeit von Harnsäure und Uraten beeinflussen, geht auch aus den Untersuchungen von Bechhold und Ziegler hervor<sup>3)</sup>. Nach Taylor löst eine reine Globulinlösung fünfmal soviel Harnsäure als Wasser und 8 Wochen lang dialysiertes Blutserum löst nach Pauli und Samec rund 1,5 mal soviel Harnsäure als Harn<sup>4)</sup>. Auf diese spezifische Harnlöslichkeit der Harnsäure sind auch jene Fälle zurückzuführen, welche zeigen, dass das Ausfallen von Uratsedimenten<sup>5)</sup> und die Löslichkeit der Harnsäure im Harn nicht ausschliesslich von der Acidität des Harns abhängen (Hindhede, l. c.).

Während die Harnsäure aus wässrigen Lösungen durch Chlorbarium quantitativ gefällt wird (S. 1021)<sup>6)</sup>, wird die Harnsäure des Harns durch Bariumchlorid nicht gefällt (S. 1028)<sup>7)</sup>.

Beobachtungen über die Zersetzlichkeit der Harnsäure im steril aufbewahrten Menschenharn habe ich noch nicht abgeschlossen. Es scheint, dass die Harnsäure im Harn beständig ist, als in reiner wässriger Lösung.

**Darstellung.** Zur Darstellung im grossen lässt sich der Harn schon darum nicht verwenden, weil er viel zu arm an Harnsäure ist. Es eignen sich dazu nur Schlangenexkreme und Guano.

1. Aus Schlangenexkrementen. Die gepulverten Exkreme werden nach Bensch<sup>8)</sup> in 5proz. Kalilauge gelöst und so lang damit gekocht, bis der Geruch nach Ammoniak verschwunden ist. Darauf leitet man durch die filtrierte Lösung einen lebhaften Strom Kohlensäure, bis der anfangs gallertige Niederschlag körnig und die Flüssigkeit beinahe neutral geworden ist. Der so entstandene Niederschlag von saurem Kaliumurat wird mit Wasser gewaschen, bis das Waschwasser in der zuerst abgelaufenen Lauge eine Trübung hervorruft. Man löst das Salz in verdünnter Lauge und giesst es noch heiss in überschüssige Salzsäure. Das Verfahren lässt sich auch auf Hühner- oder Taubenkot anwenden. — Ist die Lösung des Urats in Lauge noch stark gefärbt, so behandelt man diese zweckmässig nochmals mit Kohlensäure; die aus diesem zweiten Niederschlag abgeschiedene Harnsäure ist dann nur noch schwach gelb, aber für die meisten Zwecke genügend rein. — Auch die käufliche Harnsäure muss, wenn sie nicht bloss aus Krystallen besteht, diesem Reinigungsverfahren unterworfen werden; die Ausbeute beträgt nur ungefähr 50 %. Es wird sich lohnen, die in Lösung gebliebene Harnsäure durch Eindampfen zu gewinnen. Über die Gewinnung ganz reiner Harnsäure s. o. bei der Darstellung der Urate.

2. Aus Guano. Peru-Guano wird so oft mit Kalkmilch und Wasser ausgekocht, als der Auszug noch gefärbt ist, der bleibende Rückstand dann so lange mit kohlen saurem Natron ausgekocht, bis das Filtrat mit Salzsäure keinen Niederschlag mehr gibt. Die gesamte Lösung wird zuerst mit essigsaurem Natron, dann bis zur sauren Reaktion mit Salzsäure versetzt, der aus Harnsäure und Guanin

<sup>1)</sup> 20. Kongr. f. inn. Med. 1902. 219.

<sup>2)</sup> Zeitschr. f. ph. Ch. **64**. 144. 1910.

<sup>3)</sup> Bioch. Zeitschr. **24**. 146. 1910.

<sup>4)</sup> Journ. biol. Ch. **1**. 177. 1907. — Pauli u. Samec, Bioch. Zeitschr. **17**. S. 242. 1909.

<sup>5)</sup> Smith Jerome, Journ. of Phys. **23**. 315. — Zur Lösungsfähigkeit des Harns für Harnsäure vgl. auch Singer, Deutsche Ärzte-Zeitung 1903. 505.

<sup>6)</sup> N. Chr. Geelmuyden, Zeitschr. f. analyt. Ch. **31**. 166. 1892.

<sup>7)</sup> Pariete de la Cruz, Münch. med. Wochenschr. 1910. 1029.

<sup>8)</sup> A. Bensch, Ann. d. Ch. u. Pharm. **54**. 190. 1845.



bestehende Niederschlag ausgewaschen und darauf mit mässig verdünnter Salzsäure ausgekocht, wobei das Guanin in Lösung geht, die Harnsäure aber grösstentheils zurückbleibt (Strecker<sup>1)</sup>).

Als farblos ist eine Harnsäure nur dann zu bezeichnen, wenn ihre Lösung in Lauge oder die abgeschiedene freie Harnsäure farblos erscheint. Das saure Urat aus noch gelber Säure ist oft schneeweiss. Aus dem Harn abgeschiedene Harnsäure nach dem Verfahren von Bensch (S. 1037) völlig von Farbstoff zu befreien, scheint kaum möglich; die Säure behält immer einen Stich ins Bräunlichgelbe. Auch bleibt viel Harnsäure in der Bicarbonatlauge gelöst; um den ganz erheblichen Verlust zu vermeiden, dampft man diese zur Trockne ein und behandelt den Rückstand mit Wasser, welches den Farbstoff aufnimmt und das Urat wenig gefärbt zurück lässt. Dieses Urat verarbeitet man mit dem durch Kohlensäure niedergeschlagenen Anteil. Gössmann entfärbt die kochende Lösung der Harnsäure in Natronlauge mit wenig Permanganat und fällt das Filtrat mit Salzsäure. Gibbs<sup>2)</sup> kocht die alkalische Lösung kurze Zeit mit 5 % der Harnsäure an Kaliumbichromat, schüttelt das Filtrat mit Tierkohle, fällt mit Salzsäure und kocht die Harnsäure zuletzt wiederholt mit starker Salzsäure aus. Die Lösung lässt sich auch durch Natriumamalgam entfärben (Hlasiwetz). Ganz rein erhält man die Harnsäure, wenn man ihr Sulfat (S. 1023) so oft aus konzentrierter Schwefelsäure (durch Lösen in Wasserbadwärme und Erkaltenlassen) umkrystallisiert, bis sich die Schwefelsäure nicht mehr färbt, das Salz dann mit Wasser zersetzt und die Schwefelsäure gewaschen, doch wird man nur selten in die Lage kommen, dieses umständliche Verfahren, gegenüber dem von Bensch, einzuschlagen.

Vom Erythrin der ziegelroten Sedimente lässt sich die Harnsäure nach Zoja befreien, wenn man eine Lösung des Sediments in heissem Wasser mit Amylalkohol schüttelt, beim Erkalten krystallisiert die Harnsäure farblos aus.

3. Aus Harn. Die Darstellungsweisen der Harnsäure haben wesentlich nur für den Nachweis und vor allem für die quantitative Bestimmung der Harnsäure im Harn Bedeutung.

a) Man versetzt eiweissfreien Harn mit  $\frac{1}{40}$ — $\frac{1}{20}$  Vol. konzentrierter Salzsäure oder Essigsäure und lässt 24—48 Stunden stehen. Die Harnsäure setzt sich dabei in meist sehr gefärbten Krystallen am Boden und an der Wand des Gefässes ab.

Auf diese Weise erhält man nicht alle Harnsäure, aus manchen Harnen auch gar keine. Aus Hundeharn fällt die Harnsäure gemischt mit Kynurensäure und ist von dieser nach Meissner und Shepard (S. 875) zu trennen.

b) Man löst nach Jaffé in Harn bis nahe zur Sättigung fein gepulverte Pikrinsäure (1 g auf 150 cem Harn) oder versetzt je 100 cem Harn mit 20 cem einer 5proz. alkoholischen Pikrinsäurelösung, wäscht den Niederschlag erst mit wässriger Pikrinsäurelösung, dann mit Alkohol, trocknet einigermassen, kocht den Niederschlag mit einer mässigen Menge 3—6fach verdünnter Salzsäure und schüttelt nach dem Erkalten die Pikrinsäure mit Äther aus. Aus der wässrigen Lösung scheidet sich die Harnsäure binnen mehreren Stunden vollständig aus. Sehr zweckmässig ist die Verwendung von Magnesumpikrat, welches sich in grosser Menge im Harn auflöst.

c) Der Harn wird nach E. Ludwig<sup>3)</sup> gleichzeitig mit Magnesiainmischung und ammoniakalischer Silberlösung gefällt, der Niederschlag mit Hilfe der Wasserluftpumpe mit ammoniakhaltigem Wasser ge-

<sup>1)</sup> Strecker, Ann. d. Ch. u. Pharm. 118. 152.

<sup>2)</sup> Gössmann, Ann. d. Ch. u. Pharm. 99. 374. — W. Gibbs, Zeitschr. f. Ch. [2] 5. 729. 1869.

<sup>3)</sup> E. Ludwig, Anzeiger der k. Akademie d. Wissensch., mathem. naturw. Kl., 18. 92. 1881; Zeitschr. f. anal. Ch. 21. 148; Wiener med. Jahrb. 1884. 599; Zeitschr. f. anal. Ch. 24. 637.

waschen, durch Erwärmen mit einer Lösung von Einfach-Schwefelalkali zerlegt, die Lösung filtriert und das Filtrat nach dem Ansäuern mit Salzsäure auf ein kleines Volumen eingedampft. Die Harnsäure fällt dabei krystallinisch aus.

Von beigemengtem Schwefel befreit man sie durch Waschen mit Schwefelkohlenstoff und verdrängt diesen zuletzt mit Äther. Der Harn muss eiweissfrei sein, darf aber Albumose enthalten. Durch die Silberlösung werden auch die Xanthinbasen gefällt, aber zuletzt von der Salzsäure wieder gelöst. Das Verfahren ist dem unter 3. a. beschriebenen bei weitem vorzuziehen, da man mit demselben alle Harnsäure aus dem Harn fällt und sich so auch noch sehr geringe Mengen Harnsäure nachweisen lassen.

Salkowski<sup>1)</sup> hat zuerst gezeigt, dass sich die der Fällung durch Säure entgehende Harnsäure aus dem Filtrat noch durch ammoniakalische Silberlösung gewinnen lässt und Maly hat nachgewiesen, dass der dabei entstehende Niederschlag ein Doppelsalz der Harnsäure mit Silber und einer zweiten Basis ist. Ludwig hat das Verfahren insofern vereinfacht, als er die gesamte Harnsäure auf einmal als Silber-Magnesiumsalz fällt.

Die Magnesiummischung und die ammoniakalische Silberlösung werden vor dem Zusatz zu dem Harn gemischt und falls ein Niederschlag von Chlorsilber entsteht, dieser durch Ammoniak in Lösung gebracht. Entsteht dabei ein flockiger Niederschlag (von Magnesiumhydrat), so kann man diesen wieder durch Salmiak lösen. Mit dem Urat fällt zugleich viel Tripelphosphat, was beabsichtigt ist, da es das Auswaschen des sonst gelatinösen Niederschlags erleichtert. Das Schwefelalkali muss aus salpeterfreiem Alkalihydrat bereitet werden, weil sich sonst beim Ansäuern des Filtrats vom Schwefelsilberniederschlag mit Salzsäure Chlor entwickelt, welches Harnsäure zerstört. Die Digestion des Harnsäureniederschlags mit dem (alkalihydrathaltigen) Einfach-Schwefelalkali darf nicht über die zur Zersetzung des Silberniederschlags erforderliche Zeit hinaus ausgedehnt werden, weil dabei sonst ein merklicher Verlust von Harnsäure eintritt. Zur Darstellung der Harnsäure kann man sich derselben Lösungen bedienen, welche für die quantitative Bestimmung der Harnsäure nach der angeführten Methode vorgeschrieben werden.

Ist wie im Hunde- und Kaninchenharn oft sehr wenig Harnsäure zugegen, so empfiehlt es sich, den Harn vorher in der auf S. 1023 beschriebenen Weise mit Phosphorwolframsäure zu reinigen. Statt mit Schwefelalkali den Silbermagnesiumniederschlag zu zersetzen, ist es empfehlenswerter, ihn mit Schwefelwasserstoff zu zerlegen und dann die Flüssigkeit samt dem meist kolloiden Silbersulfür zur Trockene zu verdampfen. Die Harnsäure hinterbleibt dann als Magnesiumsalz und kann dem Rückstand als solche vollständig mit heissem Wasser entzogen werden. Auch empfiehlt es sich, um die ebenfalls zersetzend wirkende Salpetersäure zu vermeiden, die ammoniakalische Silberlösung nicht aus Silbernitrat, sondern aus — Oxyd, Chlorid oder — Acetat herzustellen. Das Filtrat und die Waschwässer werden nach dem Ansäuern mit Salzsäure eingeeengt, hierbei fällt die Harnsäure krystallisiert aus.

d) Sättigt man den Harn mit Chlorammon, so fällt, wie Hopkins<sup>2)</sup> zuerst nachwies, alle Harnsäure als Ammonurat aus (3. a., S. 1020). Man löst den Niederschlag in heissem Wasser, fügt reichlich Salzsäure hinzu und lässt, wenn die Lösung verdünnt war, nach dem Einengen, erkalten, wobei die Harnsäure meistens gefärbt auskrystallisiert. Ein Teil des Farbstoffes lässt sich mit Alkohol wegwaschen.

Zum Sättigen des Harns genügt, wenn man auf 100 ccm 30 g Salmiak in demselben auflöst; darnach muss der Harn noch zwei Stunden stehen, wenn man sicher alle Harnsäure abscheiden will. Mit der Harnsäure fällt auch Xanthin,

<sup>1)</sup> Salkowski, Virchows Archiv 52. 60. 1871.

<sup>2)</sup> F. Gowland Hopkins, Guy's Hosp. Reports 48. 299. 1891; Chem. Zentralblatt 1892. 2. 269.

welches bei der Behandlung des Niederschlags mit Salzsäure in Lösung bleibt. — Auch aus Hundeharn kann man auf diese Weise die Harnsäure gewinnen. — Sättigen des Harns mit Ammonsulfat schlägt die Harnsäure als Ammonurat nach Garrod und Hopkins<sup>1)</sup> ebenso vollständig nieder, wie Salmiak, aber langsamer und noch minder rein. Die Fällung durch Ammonsalze soll bei alkalischer Reaktion vorgenommen werden (Zusatz von Ammoniak) weil sie sonst nicht immer vollständig ist.

e) Zur Darstellung der Harnsäure lässt sich auch nach Krüger und Wulff<sup>2)</sup> die Unlöslichkeit ihrer Kupferoxydulverbindung verwenden (S. 1022). Man versetzt den kochenden Harn mit einer Kupfervitriol- und einer Natriumbisulfidlösung, wozu auf das Liter Harn 50 ccm gesättigter Kupfervitriollösung und 25 g Bisulfit genügen, kocht noch einmal auf und wäscht den Niederschlag nach zweistündigem Stehen durch Dekantieren und zuletzt auf dem Filter einigermassen oder trennt ihn von der Flüssigkeit durch Zentrifugieren. Der Niederschlag wird darauf in warmem Wasser mit einer Lösung von farblosem Schwefelnatrium zerlegt und das Filtrat mit Salzsäure schwach übersättigt, wobei die Harnsäure, gewöhnlich mit etwas Schwefel, ausfällt. Man reinigt sie nach dem Verfahren von Bensch (1).

Mit der Harnsäure fallen ausser den Xanthinbasen auch der Rhodanwasserstoff und das Eiweiss quantitativ (Huppert<sup>3)</sup>), diese bleiben aber in der angesäuerten Flüssigkeit gelöst. Schwefelammon ist zum Zerlegen des Kupferoxydulniederschlags nicht geeignet, weil sich das unlösliche Ammonurat bilden würde. Das Schwefelalkali muss aus Natrium- und Kaliumhydrat dargestellt werden, welches keine Sauerstoffverbindungen des Stickstoffs enthält; es würden sonst bei Zusatz von Salzsäure zur alkalischen Lösung salpetrige Säure oder Salpetersäure und Chlor auftreten und Harnsäure oxydiert werden; man bereitet das Reagens daher aus Natriumhydrat e natrio. Gelbes Schwefelalkali gibt mit Säuren einen starken Niederschlag von Schwefel, der sich der Harnsäure beimengen würde. Farbloses Schwefelalkali erhält man, indem man die eine Hälfte der Lauge mit Schwefelwasserstoff sättigt und die andere Hälfte dazu giesst. Zur Zerlegung des Kupferoxydulniederschlags verwendet man wenig mehr Sulfid, als gerade nötig; man setzt so lang von dem Reagens zu, bis der Niederschlag schwarz geworden ist und prüft dann eine abfiltrierte Probe mit Kupfersulfat oder Bleiacetat auf Sulfid; vom Kupfersalz darf nur wenig zugesetzt werden, weil sonst der Niederschlag auch bei Gegenwart von Sulfid nicht schwarz erscheint, sondern von einer unlöslichen Verbindung von Harnsäure und Xanthinbasen mit Kupferoxyd grün. Eine kleine Menge der Harnsäure beigemengten Schwefels braucht nicht besonders entfernt zu werden; er verschwindet bei der Reinigung der Harnsäure nach Bensch. Vgl. auch S. 1059.

f) Zur Darstellung kann man auch das Zinkurat benützen. S. 1064.

Die Isolierung der Harnsäure aus dem Vogelharn bietet insofern Schwierigkeiten, als es nicht leicht ist, die Harnsäure in Lösung zu bringen. Nach dem Vorgang von v. Knieriem extrahiert man den getrockneten Vogelkot erst mit absolutem Alkohol oder Äther-Alkohol in der Wärme und kocht ihn dann mit 1—2proz. Natronlauge aus, wobei ein Teil der Harnsäure zerstört wird. Die filtrierte Lösung kann dann nach 1. weiter verarbeitet werden. — Bei dem von Meissner angewandten Verfahren wird das Lösen der Harnsäure in Lauge umgangen. Danach wird der Harn samt dem Kot in einer Reibschale mit Wasser zerrieben, die ganze Masse unter mässigem weiteren Wasserzusatz eine Weile gekocht, siedend heiss durch ein dichtes Tuch koliert und unter etwas Wasser stark ausgeknetet. Die Harnsäure

<sup>1)</sup> A. E. Garrod u. F. G. Hopkins, Journ. of Physiol. **20**. 118. 1896.

<sup>2)</sup> M. Krüger u. C. Wulff, Zeitschr. f. physiol. Ch. **20**. 181 u. 171.

<sup>3)</sup> Huppert, Zeitschr. f. physiol. Ch. **22**. 556. 1897.



geht dabei zum Teil in Lösung, zum Teil bleibt sie als milchige Trübung suspendiert. Man versetzt die gesamte Flüssigkeit mit Salzsäure und filtriert nach 24—48 Stunden ab. — Bensch<sup>1)</sup> hat nach dem 1. beschriebenen Verfahren aus Tauben- und Hühnerkot die Harnsäure mit fast demselben günstigen Resultat dargestellt, wie aus Schlangensexkrementen.

Mit weitaus besserem Resultate wird das zur quantitativen Bestimmung der Harnsäure im Vogelkot von Kóssa angegebene Verfahren benützt werden (s. S. 1065).

4. Aus Harnsteinen. Man zieht das feingepulverte Konkrement so oft mit verdünnter warmer Salzsäure aus, bis sich das Volumen des Pulvers nicht mehr merklich vermindert, löst den Rest in warmer verdünnter Natron- oder Kalilauge, übersättigt mit Salzsäure und lässt 24—48 Stunden stehen. War die alkalische Lösung sehr verdünnt, so dampft man nach dem Ansäuern auf ein kleines Volumen ein. Auch hier wird man das Verfahren von Kóssa anwenden können.

5. Trennung der Harnsäure von den Xanthinbasen. Auf welche Weise sich diese Trennung scharf durchführen lässt, ist bei den Xanthinbasen (S. 993 und 995) angegeben.

Zur Prüfung auf Abwesenheit von Purinbasen löst man 0,1 ccm Substanz in 5 ccm heisser verdünnter Lauge und setzt nach dem Erkalten etwas Diazobenzolsulfosäure zu. Tritt keine Rotfärbung ein, so sind keine Purinbasen zugegen (Burian<sup>2)</sup>). Die Reaktion ist noch positiv, wenn 0,05 Xanthin in 50 ccm Lauge vorhanden sind oder 0,05 Guanin in 250 ccm.

Nachweis: a) Die mikroskopische Prüfung der erhaltenen Krystalle ist insbesondere bei kleinen Mengen sehr wertvoll. Bei der mikroskopischen Untersuchung können die S. 1010 geschilderten Formen sämtlich vorhanden sein, erweisen sich aber nicht alle als charakteristisch. Für die Gegenwart von Harnsäure sprechen die rhombischen Tafeln und die Wetzsteinformen, namentlich dann, wenn letztere gelb oder braun gefärbt sind. Man kann in Zweifelfällen zu den Krystallen auf dem Objektträger einen Tropfen konzentrierter Natronlauge fliessen lassen: Harnsäure löst sich auf. Auf Zusatz von einem Tropfen konzentrierter Essigsäure zu der erhaltenen Lösung scheidet sich die Harnsäure allmählich wieder aus, namentlich an festen Substanzen (einem Pflanzenfäserchen etc.) und zwar nun häufig in regelmässig ausgebildeten, weniger gefärbten rhombischen Täfelchen. — Harnsaure Salze versetzt man unter dem Mikroskop direkt mit konzentrierter Essigsäure und wartet die Ausscheidung der Harnsäure ab. — Tetraurat zersetzt sich bei anhaltender Behandlung mit Wasser in Harnsäure, welche auskrystallisiert, und saures Urat, welches in Lösung geht.

Wäscht man ein amorphes Uratsediment auf dem Objektträger in der Weise, dass man auf der einen Seite des Deckgläschens Wasser zufließen lässt und es auf der anderen Seite mit Fliesspapier wieder wegnimmt, so lässt sich diese Zersetzung unter dem Mikroskop wahrnehmen (Roberts).

b) Man stellt die Murexidprobe an (S. 1029).

<sup>1)</sup> W. v. Knieriem, Zeitschr. f. Biol. 13. 41. — G. Meissner, Zeitschr. f. rat. Med. [3] 31. 198. — Bensch, Ann. d. Ch. u. Pharm. 54. 190.

<sup>2)</sup> Zeitschr. f. ph. Ch. 43. 501. 1905.



Bei Verwendung von Salpetersäure geben das Xanthin, das Guanin, das Epiguanin und eine von Krüger im Harn entdeckte später als Hypoxanthin erkannte Base bei Verwendung von Chlor das Xanthin und seine beiden Homologen die Reaktion gleichfalls in ähnlicher Weise. Eine Verwechslung mit diesen Basen ist ausgeschlossen, wenn die zu der Probe verwendete Substanz in einer genügenden Menge Salzsäure unlöslich war.

Am empfindlichsten wird die Probe, wenn man mit stark verdünnter Salpetersäure auf dem Wasserbade zur Trockene verdampft und nach dem Verschwinden der Flüssigkeit noch einige Zeit zur völligen Trocknung erhitzt. Erst in diesem Stadium tritt die Rotfärbung des Rückstands ein.

Nach Meissner und Shepard <sup>1)</sup> wird die Probe durch die Gegenwart von Bernsteinsäure oder eines bernsteinsäuren Alkalis sowie von Kynurensäure erheblich beeinträchtigt oder selbst ganz behindert, während andere organischsaure Alkalien nicht so nachteilig wirken wie die genannten Säuren.

Eine Abart der Murexidprobe ist die von Malerba <sup>2)</sup> angegebene Reaktion. Die Harnsäure wird mit Salpetersäure schwach erwärmt und die Probe nach dem Erkalten mit einigen Tropfen einer 1—2 proz. wässrigen Lösung von Dimethylparaphenylendiamin (Paraamidodimethylanilin) versetzt. Es tritt eine purpurrote Färbung ein, die beim Erwärmen und Abdampfen schön violettblau wird. Die Färbung verschwindet beim Erkalten und kehrt in der Wärme wieder. Die alkoholische Lösung der violettblauen Substanz hält sich lange; wenige Tropfen der Lösung hinterlassen beim Eindampfen einen violettblauen Rückstand, der bei weiterem Erhitzen rot wird.

Trocknet man die zu prüfenden Krystalle mit verdünnter Salpetersäure auf dem Wasserbade ein, erwärmt aber nicht so lange, bis die Rotfärbung auftritt, gibt 2—3 Tropfen konzentrierter Schwefelsäure und einige Tropfen thiophenhaltiges Benzol zu, so erhält man eine blaue Färbung, welche nach dem Verdunsten des Benzols in Braun übergeht und auf neuerlichen Benzolzusatz wieder auftritt (Denigès <sup>3)</sup>).

Zur Bestätigung der angeführten Proben, nicht aber zum Nachweis der Harnsäure an sich, lassen sich folgende Reaktionen verwenden.

c) Die Substanz wird in verdünnte Fehlingsche Flüssigkeit eingetragen und anhaltend gekocht; bei Gegenwart von Harnsäure entsteht ein geringer roter Niederschlag von Kupferoxydul oder ein reichlicher weisser von harnsaurem Kupferoxydul (S. 1026).

Der rote Niederschlag von Kupferoxydul lässt sich in der blauen Fehlingschen Flüssigkeit nur schwer sehen. Am sichersten nimmt man ihn wahr, wenn man die Flüssigkeit stark belichtet und gegen einen dunklen Hintergrund hält. Das auf diese Weise erhaltene Oxydul setzt sich, namentlich beim Abkühlen der Flüssigkeit, schnell ab, und man findet es leicht eher am Boden des Reagensglases abgelagert als in der Flüssigkeit suspendiert.

Stadthagen <sup>4)</sup> hat diese Reaktion insofern abgeändert, als er die Probe mit einigen Tropfen einer Lösung von arseniger Säure in Alkali gelinde erwärmt

<sup>1)</sup> G. Meissner und C. U. Shepard, Untersuchungen über die Entstehung der Hippursäure im tierischen Organismus. Hannover 1866. 113 u. 203.

<sup>2)</sup> P. Malerba, Atti della R. Accad. med. e chir. di Napoli 48. Jahresber. f. Tierch. 1894. 76.

<sup>3)</sup> Journ. de Pharm. et de Ch. 18. 161. 1888.

<sup>4)</sup> Stadthagen, Virchows Archiv 109. 399. 1887.

und dann tropfenweise Kupfersulfat hinzufügt. Durch die arsenige Säure wird das Kupferoxyd zu Oxydul reduziert und dieses gibt mit der Harnsäure sofort den Niederschlag von harnsaurem Kupferoxydul. — Kupferoxydul lässt sich noch in verschiedener anderer Weise erzeugen. — Die Probe allein für sich ist trügerisch; auch die Xanthinbasen und der Rhodanwasserstoff werden gefällt.

d) Man löst die Substanz, nötigenfalls unter Zuhilfenahme von wenig Natronlauge und setzt salpetersaures Silber zu; tritt nicht sogleich ein schwarzer Niederschlag auf, so fällt man mit dem Silbernitrat aus, filtriert schnell und setzt dem Filtrat etwas kohlenaures Natron zu; ist Harnsäure vorhanden, so entsteht jetzt ein schwarzer Niederschlag. — Oder man benetzt einen Streifen Papier mit salpetersaurem Silber und spritzt auf die feuchte Stelle verdünnte Sodalösung; betupft man das so gebildete kohlenaure Silber mit einer Lösung von Harnsäure oder harnsaurem Natron, so entsteht ein schwarzer Fleck (H. Schiff<sup>1)</sup>).

Gerbsäure und Schwefelwasserstoff geben diese Reaktion auch, sehr verdünnte Ameisensäure nicht oder langsam, dagegen nicht Eiweiss, Gallenbestandteile, Hippursäure, Benzoësäure, Oxalsäure, Leucin, Harnstoff.

Bei gleichzeitiger Anwesenheit von Ammoniak und viel Ammonsalz entsteht dagegen ein weisser grossflockiger oder gallertiger Niederschlag.

e) Eine Lösung von Wolframsäure (Maschke) oder Phosphormolybdänsäure (Offer) in überschüssiger Natron- oder Kalilauge wird durch Harnsäure infolge der Reduktion der Wolfram- oder der Molybdänsäure blau und kann einen blauen Niederschlag abscheiden (S. 1027). Die Reaktion wird auch erhalten durch Eiweiss, Alkaloide, Gerbsäure (Offer), Lävulose (Maschke), aber nicht durch Harnstoff, Kreatinin (Maschke, Offer), Traubenzucker oder Rohrzucker (Maschke).

Moreigne<sup>2)</sup> verwendet eine folgendermassen dargestellte Lösung von Phosphorwolframsäure: 20 wolframsaures Ammonium, 10 Phosphorsäure 1:3,100 Wasser. Nach dem Kochen der Mischung wird mit Salzsäure angesäuert.

f) Ganassini<sup>3)</sup> verwendet direkt die Fällung der Harnsäure mit Zinksulfat oder ammoniakalischer Silberlösung und Magnesiamixtur. Behandelt man diese Fällungen mit Alkali und Oxydationsmitteln (Halogene, Persulfat, Ferricyanid), so entsteht eine blaugrüne Färbung. Die Purinbasen geben diese Reaktion nicht. Eiweiss stört sie nicht. Dagegen verschwindet sie nach dem Ansäuern oder durch einen Überschuss an Alkali.

g) Die Glyoxylsäurereaktion mit konzentrierter Schwefelsäure und Pepton oder Tryptophanlösung mit reiner Harnsäure ist negativ, mit teilweise zersetzter positiv (ältere Uratpräparate<sup>4)</sup>).

Bestimmung:

## I. Der reinen Harnsäure.

### 1. Acidimetrisch.

A. Prinzip. Die Harnsäure bildet nach Tunnicliffe<sup>5)</sup> mit Piperidin ein weisses, krystallinisches, einfach saures Salz  $C_5H_4N_4O_3$ .

<sup>1)</sup> H. Schiff, Ann. d. Ch. u. Pharm. **109**. 67.

<sup>2)</sup> E. Ledure, Ann. ch. analyt. appl. **12**. 194. 1907.

<sup>3)</sup> Boll. di chim. e. di farm. **47**. 715. 1908.

<sup>4)</sup> W. Wiechowski, Bioch. Zeitschr. **25**. 456; Zeitschr. f. ph. Ch. **77**. 303. 1912.

<sup>5)</sup> F. W. Tunnicliffe, British med. Journ. 27. Februar 1897.

$C_5H_{11}N$ , welches mit Wasser von 15° eine 5,3%ige Lösung bildet, in heissem Wasser noch leichter löslich ist und gegen Lackmus schwach alkalisch, gegen Phenolphthalein aber neutral reagiert. Diese Eigenschaften des Salzes haben Tunnicliffe und Rosenheim<sup>1)</sup> zur quantitativen Bestimmung der freien Harnsäure benützt.

#### B. Erfordernis.

Eine  $\frac{1}{20}$  normale Piperidinlösung. Dieselbe soll im Liter 4,25 g Piperidin enthalten. Man löst etwas mehr als die berechnete Menge reines Piperidin in 1 Liter Wasser und stellt die Lösung unter Verwendung von Phenolphthalein als Indikator auf  $\frac{1}{20}$  oder  $\frac{1}{10}$  normal Salzsäure. Der Kubikzentimeter zeigt 8,4 mg Harnsäure an.

C. Ausführung. Man erhitzt die Harnsäure, solche aus Harn, nachdem sie säurefrei gewaschen worden ist, in einem Kölbchen mit Wasser zum Sieden, wobei auf 0,1 g Harnsäure 15–20 ccm Wasser genügen, setzt einige Tropfen Phenolphthalein zu und lässt die Piperidinlösung zufließen. Das Ende der Reaktion erkennt man daran, dass die Harnsäure in Lösung gegangen ist und die Flüssigkeit eine schwache Rotfärbung angenommen hat. Bei Harnsäure aus Harn ist wegen ihres starken Farbstoffgehaltes der Eintritt der roten Färbung nur unsicher zu erkennen; den Farbstoff kann man aus der Harnsäure zwar teilweise durch Waschen derselben mit Alkohol entfernen, man tut aber gleichwohl gut, darauf zu achten, ob sich die Harnsäure ganz gelöst hat. Eine Verflüchtigung des Piperidins findet dabei nicht statt.

Die Bestimmung fällt sehr genau aus; bei reiner Harnsäure wurde im Mittel von 10 Bestimmungen 0,17% zu wenig gefunden; bei der aus Harn gefällten Harnsäure war die Abweichung von der Bestimmung durch Wägen etwas grösser.

Man kann die Harnsäure auch mit Lauge eventuell nach vorherigem Versetzen mit neutralisiertem Formaldehyd (Sørensen) unter Verwendung von Methylorange<sup>2)</sup> als Indikator titrieren. Hierbei reagiert die Harnsäure als einbasische Säure d. h. 1 ccm n/10 Lauge entspricht 16,8 mg Harnsäure. Poulein verwendet zum Titrieren Barytlauge und Phenolphthalein als Indikator<sup>3)</sup>.

## 2. Mit Permanganat.

A. Prinzip. Versetzt man eine Lösung von Harnsäure in warmer verdünnter Schwefelsäure mit Permanganatlösung, so verschwindet die Farbe des Permanganats anfangs sofort, zuletzt wird aber die Flüssigkeit auf Zusatz von Permanganat zwar nicht dauernd, aber doch einen Augenblick rot. Die Menge des Permanganats, welche bis zu diesem Endpunkt verbraucht wird, ist nach Blarez und Denigès<sup>4)</sup>, aber nur in engen Grenzen, abhängig von dem Gehalt der Flüssigkeit an

<sup>1)</sup> Tunnicliffe u. O. Rosenheim, Zentralblatt f. Phys. 11. 434. 1897.

<sup>2)</sup> R. Hermann, Diss. Berlin 1898.

<sup>3)</sup> Thèse de Lille 1900. J. T. 31.

<sup>4)</sup> Ch. Blarez und G. Denigès, Comptes rendus 104. 789. 1887.



Schwefelsäure und der Verdünnung, bei einer Konzentration der Harnsäurelösung von 1:8000 aber unabhängig vom Gehalt der Flüssigkeit an Schwefelsäure; dann zeigt 1 ccm  $\frac{1}{10}$  normal Permanganat nach Blarez und Denigès 7,4 mg Harnsäure an, und 1 Mol. Harnsäure verbraucht 1,135 At. Sauerstoff, ein Verhältnis, welches sich nicht durch eine einfache Zersetzungsgleichung ausdrücken lässt.

Auf 1 Mol. Harnsäure wird genau 1 At. Sauerstoff verbraucht, wenn in Wasser suspendierte Harnsäure durch Permanganat zu Allantoin (Claus) oder in kalter, alkalischer Lösung zu Uroxansäure (Sundwik<sup>1)</sup>) oxydiert wird.

Unter den Bedingungen, unter welchen Hopkins die Titrierung der Harnsäure vornimmt, zeigt der ccm  $\frac{1}{20}$  n-Permanganat nach Hopkins 3,75, nach v. Ritter 3,61 mg Harnsäure an. Die Verschiedenheit des Titors dürfte darin begründet sein, dass Hopkins die Permanganatlösung durch Wägen bereitete, v. Ritter<sup>2)</sup> auf Eisen oder Tetraoxalat stellt.

### B. Erfordernis.

Eine  $\frac{1}{20}$  normale Permanganatlösung mit 1,581 Permanganat im Liter; sie wird auf eine  $\frac{1}{20}$  normale Oxalsäure oder Tetraoxalatlösung gestellt, wie bei der Herstellung der Lösung zur titrimetrischen Bestimmung des Eisens (S. 177); die verwendete Oxalsäure muss aschefrei sein. Der Titer der Lösung ändert sich leicht beim Aufbewahren und ist daher öfters aufs neue zu ermitteln.

C. Ausführung. Die Harnsäure wird heiss in möglichst wenig chloridfreiem Natriumcarbonat gelöst, die Lösung nach dem Erkalten mit Wasser auf 100 ccm aufgefüllt, darauf mit 20 ccm konzentrierter Schwefelsäure versetzt und sogleich mit der Permanganatlösung titriert. Bei Verwendung reiner Harnsäure in Mengen, wie sie in 100 ccm normalem Harn vorkommen (ungefähr 50 mg) fällt die Titrierung auf 0,5 mg genau aus. Auch in Ammonurat lässt sich auf diese Weise die Harnsäure titrieren.

Um sich eine richtige Vorstellung von der Endreaktion zu verschaffen, tut man gut, abgewogene Mengen reiner Harnsäure nach diesem Verfahren zu titrieren; man weiss dann im voraus, bei welchem Verbrauch an Permanganat sie eintritt. Die nach Bensch (S. 1037) gereinigte, salzfrei gewaschene Harnsäure ist dazu vollkommen geeignet.

M. Fontana versetzt die schwefelsaure Lösung der Harnsäure mit einem Überschuss einer  $\frac{10}{100}$ igen auf Harnsäure gestellten Permanganatlösung und titriert den Permanganatüberschuss mit Oxalsäure zurück<sup>3)</sup>.

<sup>1)</sup> Claus, Berichte d. chem. Gesellsch. 7. 227. 1874. — E. E. Sundwik, Zeitschr. f. physiol. Ch. 20. 335. 1894.

<sup>2)</sup> F. Gowland Hopkins, Guys Hospital Reports 48. 299. 1891; Journ. of Pathol. and Bacteriology 1. 455. 1892; Proc. of the London roy. Soc. 52. 96. 1892. — G. v. Ritter, Zeitschr. f. physiol. Ch. 21. 290. 1895.

<sup>3)</sup> Riv. veneta sc. med. 20. fasc. 6. 1903; Arch. f. Verd.-Krankheiten. 9. 600. 1903.



## 3. Als Silber-Magnesiumsalz.

Versetzt man eine alkalische Harnsäurelösung zugleich mit ammoniakalischer Silberlösung und Magnesiummischung, so fällt ein Urat aus, welches auf 1 Mol. Harnsäure 1 At. Silber enthält. Die in dem Niederschlag enthaltene Menge Harnsäure lässt sich in verschiedener Weise direkt und indirekt ermitteln.

1. Man zerlegt das Urat durch Digestion mit Natrium- oder Kalium-sulfhydrat in der Wärme, säuert das Filtrat, welches die Harnsäure als Alkalisalz enthält, mit Salzsäure an und dampft zur Krystallisation ein. Die ausgeschiedene Harnsäure kann gewogen oder ihre Menge durch Titrieren nach I. 1. oder 2. bestimmt werden. Dieses Verfahren ist die Grundlage der Bestimmung der Harnsäure im Harn nach Ludwig und ist unter II. 1. ausführlich beschrieben.

2. Durch Bestimmung des im Niederschlag enthaltenen Stickstoffs (a).

3. Durch Ermittlung seines Gehaltes an Silber (b).

4. Durch Zurücktiteren des in Lösung gebliebenen Überschusses an Silber (c).

## a) Durch Bestimmung des Stickstoffgehalts.

Der gelatinöse Niederschlag wird auf einem kleinen Filter gesammelt und, wie S. 1039 u. 1053 angegeben ist, ammoniakfrei gewaschen. Dieser Niederschlag lässt sich aber nicht ohne weiteres für die Stickstoffbestimmung verwenden, denn er enthält, wie Salkowski gezeigt hat, noch Ammoniak in nicht zu vernachlässigenden Mengen. Von diesem Ammoniak lässt sich der Niederschlag aber nach Arnstein<sup>1)</sup> mit Leichtigkeit vollständig befreien, wenn man ihn (samt Filter) mit Wasser und etwas Magnesia kocht. Die Stickstoffbestimmung wird nach Kjeldahl vorgenommen. Durch Multiplikation der gefundenen Stickstoffmenge mit 3 erfährt man die Menge der Harnsäure. Man findet nach Arnstein einige (ungefähr 3) Prozent zu wenig Harnsäure, offenbar weil das Urat nicht ganz unlöslich ist. Die Bestimmungen ergeben aber dieselben Werte wie die nach b.

Das Verjagen des Ammoniaks durch die Magnesia nimmt man im Kjeldahlkolben vor; erst nachdem das Wasser bis auf einen kleinen Rest weggekocht ist, setzt man die oxydierenden Reagentien zu (10 cem Schwefelsäure, 5 g Kaliumsulfat und 0,5—1 g Kupfersulfat).

## b) Durch Bestimmung des Silbergehalts.

Das Verfahren, welches Salkowski<sup>2)</sup> zur Bestimmung des Silbergehalts in den Silberverbindungen der Xanthinbasen angegeben hat, lässt sich nach Arnstein auch auf den Silberniederschlag der Harnsäure anwenden. Der Niederschlag wird silber- und chlorfrei

<sup>1)</sup> E. Salkowski, Pflügers Archiv **69**. 273. 1898. — Arnstein, Zentralbl. f. d. med. Wissensch. **15**. 1898. 257.

<sup>2)</sup> Salkowski, a. a. O. 282. — Arnstein, a. a. O.

gewaschen, das Filter getrocknet und in einem Porzellantiegel verascht. Dann wird das gebildete metallische Silber mit Wasser und chlorfreier Salpetersäure übergossen und das Silber durch Erwärmen im Wasserbad zur Lösung gebracht. Den Tiegel hält man dabei mit einem Uhrglas bedeckt. Das Silber löst sich bis auf einen unbedeutenden Rest (nach Salkowski Chlorsilber, wohl auch Cyansilber). Man spritzt das Uhrglas ab, überträgt die Lösung in ein Kölbchen und titriert das Silber nach Volhard mit Rhodan ammon zurück. Man richtet die Konzentration der Rhodanlösung nach der Menge des zu erwartenden Silbers (der Harnsäure) ein; 1 ccm  $\frac{1}{20}$  n Rhodanlösung zeigt 8,4 mg Harnsäure an. Das Silber zu wägen statt zu titrieren, empfiehlt sich nicht, weil man zu grosse Werte findet. Das Verfahren gibt mit dem nach a) so gut wie identische Werte.

Gute Werte erhält man auch, wenn man den chlor- und silberfrei-gewaschenen Niederschlag der Silbermagnesia-Verbindung der Harnsäure in Salpetersäure löst und mit einer gestellten Rhodanlösung titriert.

c) Durch Zurücktiteren des Silberüberschusses.

A. Prinzip. Bei diesem Verfahren wird die Fällung der Harnsäure durch Zusatz einer bekannten Menge Silbernitrat ausgeführt. Das in Lösung gebliebene Silber bestimmt man nach einem von Denigès<sup>1)</sup> angegebenen Verfahren, welches die Titrierung von Silber in ammoniakalischer Lösung gestattet. Dasselbe ist der Titration des Cyankaliums durch Silberlösung nachgebildet. Versetzt man bei dieser eine chloridhaltige Cyankaliumlösung mit Silbersalz, so bildet sich bekanntlich zunächst das lösliche Salz  $\text{AgCN}$ ,  $\text{KCN}$ , und erst wenn alles Cyankalium in diese Verbindung übergeführt ist, entsteht auf weiteren Zusatz von Silberlösung eine Trübung von Chlorsilber. Denigès verfährt nun so, dass er die ammoniakalische Silberlösung mit einem Überschuss von Cyankalium versetzt und den Überschuss mit Silberlösung unter Zuhilfenahme von Jodkalium als Indikator zurücktiteriert. Wenn von dem Silbersalz mehr zugesetzt wird, als für das Doppelsalz erforderlich ist, so bildet sich das in Ammoniak unlösliche Jodsilber, wodurch das Ende der Reaktion angezeigt wird. Sind die Lösungen aufeinander gestellt, so gibt diejenige Menge Silberlösung, welche zum Zurücktiteren der Cyankaliumlösung verbraucht wird, auch die Menge der zur Bindung der Harnsäure verbrauchten Silberlösung an. Wegen der wenn auch geringen Löslichkeit des Jodsilbers in Ammoniak hat man nur darauf zu achten, dass bei der Titrierung der Harnsäure die Lösung nahezu so viel Ammoniak und Jodkalium enthält, als bei der Titerstellung der Lösungen, wobei es mehr auf den absoluten Gehalt der Lösung an Ammoniak ankommt als auf den relativen. Dieser Bedingung wird in der folgenden, nach Versuchen von Arnstein abgeänderten Vorschrift entsprochen.

<sup>1)</sup> G. Denigès, Comptes rendus **117**. 1078. 1893; Bulletin de la Soc. chim. [3] **11**. 226. 1894.

## B. Erfordernisse.

1.  $\frac{1}{50}$  n-Silberlösung (mit 3,4 g Silbernitrat im Liter), der ccm zeigt 3,36 mg Harnsäure an.

Die von Denigès vorgeschriebene  $\frac{1}{10}$  n-Silberlösung erscheint zu konzentriert; 1 ccm derselben zeigt 16,8 mg Harnsäure an, und ein Tropfen, 20 zu 1 ccm gerechnet, 0,84 mg; der Titrierungsfehler könnte zu gross ausfallen und wir haben an Stelle der  $\frac{1}{10}$  n-Silberlösung eine  $\frac{1}{50}$  normale gesetzt. Eine andere Silberlösung zum Fällen des Harns zu verwenden wie zum Titrieren, kann zu einer Fehlerquelle werden.

2. Magnesiämischung. Nach Denigès soll man 150 g Salmiak und 100 g Chlormagnesium zunächst in ungefähr 750 ccm (20 proz.) Ammoniak lösen, darnach mit Ammoniak (von derselben Stärke) auf 1 Liter auffüllen und filtrieren. Mit der Magnesiämischung werden 750 ccm der  $\frac{1}{50}$  n-Silberlösung auf 900 ccm aufgefüllt; 75 ccm der silberhaltigen Mischung enthalten 62,5 ccm der Silberlösung. — Denigès gibt nichts über die Konzentration des Ammoniaks an; aber bei dem Vermischen der Magnesiälösung mit der Silberlösung darf kein Chlorsilber ausfallen, was bei Verwendung von 10 proz. Ammoniak nicht der Fall ist.

3. Eine 20 proz. Jodkaliumlösung, welche, um sie farblos zu erhalten, mit 2 % Ammoniak versetzt wird.

4. Eine Cyankaliumlösung, von welcher 10 ccm 25 ccm der Silberlösung entsprechen, von Denigès als  $\frac{1}{30}$  normal bezeichnet. Es werden 10 g reines Cyankalium in ungefähr 1 Liter Wasser gelöst, die Lösung mit 10 ccm (20 proz.) Ammoniak versetzt und filtriert. Der Ammoniakzusatz macht die Lösung haltbarer. Zur Titerstellung misst man 20 ccm der Lösung mit einer Bürette ab, verdünnt mit 100 ccm Wasser, fügt 10 ccm 20 proz. Ammoniak und einige (10) Tropfen der Jodkaliumlösung hinzu, und lässt Silberlösung bis zur bleibenden schwachen Trübung zufließen. Darnach wird die Lösung auf die angegebene Verdünnung gebracht; das Volumen beträgt dann gegen 1,5 Liter. Der Titer der Lösung ist öfter zu prüfen.

C. Ausführung. Man löst die Harnsäure (oder das harnsaure Ammon, wenn die Harnsäure als dieses Salz gewonnen wurde) unter Erwärmen in kohlensaurem Natron, giesst die Lösung in einen Masszylinder und spült das Kölbchen gut nach. Dann lässt man aus einer Bürette 75 ccm der Silber-Magnesiämischung zufließen, füllt mit Wasser auf 175 ccm auf, schüttelt um und filtriert. Vom Filtrat versetzt man 140 ccm ( $\frac{4}{5}$  des ursprünglichen Volumens), wie bei der Titerstellung mit 20 ccm der Cyankaliumlösung, 10 Tropfen der Jodkaliumlösung und titriert mit der  $\frac{1}{50}$  n-Silberlösung bis zur bleibenden Trübung. Rechnet man für jeden bis zu diesem Punkte verbrauchten Kubikzentimeter der Silberlösung 4,2 mg Harnsäure, so erhält man die Menge der im ursprünglichen Volumen enthaltenen Harnsäure.

Der Kubikzentimeter der  $\frac{1}{50}$  n-Silberlösung zeigt 3,36 mg Harnsäure an; da man nur  $\frac{4}{5}$  der ursprünglichen Lösung titriert hat, so hat man diesen Wert mit  $\frac{5}{4}$  zu multiplizieren. Die verwendeten 50 ccm Silberlösung reichen aus zum Fällen von 168 mg Harnsäure.

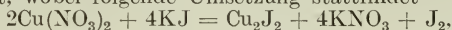
## 4. Andere Bestimmungsweisen.

a) Nach Kreidl<sup>1)</sup>. Löst man Harnsäure in einem mässigen Überschuss von Normalalkali, setzt soviel  $\frac{1}{30}$  n-Jodlösung zu, dass die Flüssigkeit schwach gelb gefärbt ist, und übersäuert nach dreiviertel Stunden schwach mit Salzsäure, so ergibt die Titration des überschüssigen Jods mit Thiosulfat, dass auf 1 Mol. Harnsäure 2,3 At. Jod verbraucht worden sind. Titriert man das Jod sogleich zurück, so wird auf das Mol. Harnsäure auffälligerweise mehr Jod, nämlich 3,5 At. verbraucht.

<sup>1)</sup> J. Kreidl, Monatshefte f. Chemie 14. 109. 1893.



b) Nach Riegler. Oxydiert man Harnsäure mit Fehlingscher Lösung, so werden nach Rieglers direkter Bestimmung auf 1 g Harnsäure statt der erwarteten 0,7536 g im Mittel 0,8 g (0,7812—0,8333) Kupfer als Kupferoxydul abgeschieden. Zur schnellen Bestimmung des abgeschiedenen Kupferoxyduls empfiehlt Riegler, den Niederschlag mit Salpetersäure zu oxydieren, die Lösung zu neutralisieren und das Kupfer nach de Haen <sup>1)</sup> zu titrieren. Der Lösung wird viel Jodkalium hinzugefügt, wobei folgende Umsetzung stattfindet



und das freigewordene Jod mit Thiosulfat titriert.

c) Nach Mizerski. Bei der Oxydation von Harnsäure mit ammoniakalischer Silberlösung in der Wärme wird auf 0,380 g Harnsäure 1 g metallisches Silber abgeschieden (wonach auf 1 Mol. Harnsäure 4,09 At. Silber oder 2,045 At. Sauerstoff kommen). Dann soll das abgeschiedene Silber gewaschen, in Salpetersäure gelöst und nach Volhard titriert werden. Nencki <sup>2)</sup> bemerkt dazu, dass das Verfahren keine genauen Resultate liefert, hauptsächlich wegen der Schwierigkeit, das metallische Silber vollständig zu sammeln. Nach B. Zebrowski ist die Bestimmung der Harnsäure nach Mizerski unbrauchbar <sup>3)</sup>.

d) Nach Geelmuyden <sup>4)</sup>. Der Niederschlag, welcher in einer neutralen Harnsäurelösung durch Chlorbaryum entsteht, enthält fast genau so viel Stickstoff wie die zu dem Versuch verwendete Menge Harnsäure. Gegenwart von Salmiak oder einfach saurem Natriumphosphat beeinträchtigt die Fällung der Harnsäure nicht oder nur wenig, geringe Mengen Säure oder Alkalihydrat (auch Ammoniak) üben dagegen einen sehr störenden Einfluss aus. Die zur Bestimmung verwendete Harnsäure ist in der Kälte in sehr verdünnter Natronlauge zu lösen, die Lösung so zu verdünnen, dass sie nicht mehr als 1 g Säure im Liter enthält und genau zu neutralisieren. Konzentrierte Lösungen trüben sich beim Neutralisieren.

Über das Verhalten der Harnsäure im Harn gegen Bariumchlorid vgl. S. 1037.

e) Nach A. Ronchese. In schwach alkalischen Medien (Borax, Kalium oder Ammoniumbicarbonat) lässt sich die Harnsäure bei gewöhnlicher Temperatur mit Jod gut titrieren. 1 Mol Harnsäure = 2 Atome Jod. (1 cem n/10 Jodlösung = 8,4 mg Harnsäure). Die zu messende Harnsäure wird in Lauge gelöst mit Essigsäure die Lösung sauer und dann wieder mit Borax- oder Kaliumbicarbonatlösung schwach alkalisch gemacht, Stärke zugesetzt und mit Jodlösung bis zur Blaufärbung titriert <sup>5)</sup>.

f) Nach Jolles. Die Harnsäure lässt sich durch Kochen mit Permanganat in saurer Lösung vollständig in Harnstoff überführen, welcher dann nach dem Hypobromitverfahren azotometrisch geessen wird <sup>6)</sup>. Die Harnsäure wird mit 140 cem einer Schwefelsäure vom spezifischen Gewicht 1,4 zum Sieden erhitzt (wenn die Harnsäure als Ammonurat vorliegt, so soll das Ammoniak durch einstündiges Kochen mit Magnesiumoxyd zuerst entfernt werden). In die siedende Flüssigkeit wird 0,8% Kaliumpermanganat kubikzentimeterweise eingetragen. Sobald die Entfärbung nicht mehr schnell erfolgt, setzt man nur mehr Portionen von 5—6 Tropfen zu. Wenn sich die nach der Entfärbung des Permanganats zurückbleibende gelbbraune Farbe mehr als 5 Minuten hält, verdünnt man ad 500 Wasser und trägt unter beständigem Sieden innerhalb einer Stunde noch 2 cem Permanganatlösung ein. Dann wird auf 30 cem eingedampft. Löst sich hierbei noch das Mangansuperoxyd, so muss man weitere Permanganatmengen zusetzen. Nach dem Einengen wird der ausgeschiedene Braunstein durch eine

<sup>1)</sup> E. Riegler, Zeitschr. f. anal. Ch. **35**. 31 u. 92. 1896. — F. de Haen, Ann. d. Chem. u. Pharm. **93**. 237. 1854; Fresenius, quantit. Anal. 6. Aufl. **1**. 335.

<sup>2)</sup> A. Mizerski, Nowiny lekarskie 1893. 121; Jahresb. f. Tierch. 1893. 251. — Nencki, Jahresber. a. a. O.

<sup>3)</sup> Gazetta lekarska **22**. 662. 1902. J. T. 32.

<sup>4)</sup> H. Chr. Geelmuyden, Zeitschr. f. analyt. Ch. **31**. 166. 1892.

<sup>5)</sup> C. r. soc. biol. 1906. 504, 524.

<sup>6)</sup> J. T. **30**. 354. — Richter, Zeitschr. f. anal. Ch. **41**. 350; Journ. f. prakt. Ch. **67**. 374. 1903.



Spur Oxalsäure zerlegt, unter Kühlung die Flüssigkeit mit Natronlauge von 32° B. alkalisch gemacht und in das Azotometer gebracht. Wenn man bei der Oxydation so viel Permanganat zusetzt, daß der Braunstein nicht verschwindet, so ist alle Harnsäure in Harnstoff übergeführt (Richter, l. c.). Nach Falta<sup>1)</sup> und nach Matrai ist das Verfahren unbrauchbar<sup>2)</sup>.

g) A. F. Dimmrock u. F. W. Brauson zerlegen die Harnsäure mit Hypobromit und messen den gebildeten Stickstoff in einem empirisch geeichten Azotometer<sup>3)</sup>.

h) Eine colorimetrische Bestimmung wurde auf das S. 1027 erwähnte Verhalten der Harnsäure zu alkalischen Phosetonschwefelsäurelösungen von Obermeyer, Pollak und Zak (Wiener kl. Wochenschr. 1912, Nr. 49) und von Folin und Denis (Journ. of biol. Chem. XIII. Nr. 3 u. 4. 1912/13) begründet.

## II. Bestimmung der im Harn enthaltenen Harnsäure.

Die unter I angeführten Methoden zur Bestimmung der reinen Harnsäure lassen sich nicht unmittelbar auf den Harn anwenden, weil andere Harnbestandteile die Bestimmung in hohem Grade störend beeinflussen. Für die quantitative Bestimmung ist die Harnsäure aus dem Harn darzustellen.

Zur Darstellung der Harnsäure aus Harn ist der nächstliegende Weg, den nach Ansäuern des Harns ausfallenden Niederschlag zu sammeln, nicht gangbar, weil hierbei, wie bereits erwähnt, nicht alle Harnsäure des Harns gefällt wird. Die Bestimmung der Harnsäure in reinen Uratlösungen durch Abscheidung mit übersättigter Salz- besser Schwefelsäure, führt zu genauen Resultaten, wenn man Übersättigungserscheinungen durch anhaltendes Schütteln vermeidet und für den in Lösung verbleibenden Anteil der Harnsäure eine Korrektur (2 mg Harnsäure für 100 cem Flüssigkeit bei 18°) anbringt (His und Paul<sup>4)</sup>). Im Harn ist jedoch diese Methode unbrauchbar, weil einerseits nicht alle Harnsäure entsprechend ihrer Löslichkeit in verdünnter Mineralsäure gefällt wird und andererseits die Säurefällung fremde Substanzen beigemischt enthält<sup>5)</sup>. Auch wenn man ausser Mineralsäure noch gewogene Mengen Harnsäure dem Harn zusetzt und nun längere Zeit rotiert, erhält man nicht immer alle Harnsäure des Harns. Nach Meisenburg<sup>6)</sup> soll dadurch alle „freie“ Harnsäure abgeschieden werden und nur die in „komplexer“ Bindung vorhandene nicht gefällt werden. Er erhielt mit diesem Verfahren im Harn nach Thymusgenuss alle Harnsäure (zur Kontrolle wurde derselbe Harn dem Verfahren von Ludwig-Salkowski unterworfen), im Harn, der nach Koffeindarreichung entleert wurde, entging aber ein grosser Teil der vorhandenen Harnsäure der Fällung durch dieses Verfahren.

Dementsprechend wird auch das Vorgehen von N. J. Surveyor<sup>7)</sup>, welcher den Harn nach dem Ansäuern zu Eis gefriert, dann wieder auftauen lässt und die Menge des Niederschlages in einer graduierten Röhre misst, keinen Anspruch auf Genauigkeit erheben können.

Einen Anhaltspunkt über die Menge der vorhandenen Harnsäure im Harn soll man nach W. Mayzel dadurch gewinnen, dass man den Harn nach dem Ansäuern mit rauchender Salzsäure in einem Spitzglase mit einem Holzstabe schlägt. Fällt bei dieser Prozedur nichts aus, so soll die Harnsäure im Menschenharn sicher nicht abnorm vermehrt sein<sup>8)</sup>.

<sup>1)</sup> J. T. 31. 5. 32. 117.

<sup>2)</sup> Zeitschr. f. ph. Ch. 35. 205. 1902.

<sup>3)</sup> Pharm. Journ. 17. 152; Ch. Zeitschr. 1903. II. 774.

<sup>4)</sup> Zeitschr. f. ph. Ch. 31. 64. 1900.

<sup>5)</sup> Nikolaier u. Dohrn, Deutsches Arch. f. klin. Med. 91. 151. 1907.

<sup>6)</sup> Ebenda 87. 425. 1906.

<sup>7)</sup> Brit. med. Journ. 1905. II. 69.

<sup>8)</sup> Gaz. lekarska 27. 683. 1907; J. T. 37. 322.

Bei den im folgenden beschriebenen Methoden wird die Harnsäure entweder als solche oder als Ammonurat abgeschieden und zur Messung gebracht. In den Mutterlaugen von der Harnsäure wie vom Ammonurat bleiben nicht zu vernachlässigende Mengen von Harnsäure gelöst, und weitere Mengen von Harnsäure gehen bei dem unumgänglichen Waschen der abgeschiedenen Produkte in Lösung. Die dadurch der Messung entzogenen Harnsäuremengen scheinen grösser zu sein, als nach der Löslichkeit der Harnsäure in Wasser oder verdünnter Säure und nach der Löslichkeit des Ammonurats in Ammonsalzlösungen zu erwarten wäre. Die aus Harn abgeschiedene unreine, gefärbte Harnsäure und das ebenso beschaffene Ammonurat haben offenbar eine grössere Löslichkeit als die reinen Substanzen.

Man kann also die abgeschiedene Harnsäure nicht, wie es sonst bei quantitativ-analytischen Arbeiten üblich ist, bis zur Gewichtskonstanz waschen, weil niemals Konstanz erreicht wird. Unter diesen Umständen bleibt nichts anderes übrig, als bis zum Verschwinden einer Reaktion im Filtrat mit einer Flüssigkeit zu waschen, die wenig von der abgeschiedenen Substanz löst (Harnsäure aus salzsaurer Mutterlauge mit verdünnter Schwefelsäure bis zur Chloridfreiheit des Filtrats, Ammonurat mit der Lösung eines entsprechenden Ammonsalzes) und für die in Lösung gebliebenen und gegangenen Anteile eine Korrektur anzubringen. Ein solches Verfahren hat aber, abgesehen davon, dass eine exakte Ermittlung der notwendigen Korrekturen noch aussteht, den Nachteil, dass es bei sehr kleinen Harnsäuremengen offenbar zu sehr erheblichen Fehlern führen muss. Es wäre daher zu versuchen, ob sich das Verfahren, welches Kóssa zur Bestimmung der Harnsäure im Vogelkot angegeben hat, nicht auf die Behandlung isolierter Harnsäure überhaupt anwenden liesse. Nach diesem Verfahren wird die gesammte die Harnsäure enthaltende Fraktion in warmer konzentrierter Schwefelsäure gelöst, die Lösung mit Alkohol gefällt und die Fällung mit Alkohol gewaschen. Da die Harnsäure in Alkohol ganz unlöslich ist, so könnte man bei Einhaltung dieses Vorganges bis zur Gewichtskonstanz mit Alkohol waschen.

Abgesehen von diesen die Genauigkeit der Resultate beeinträchtigenden Momenten ist stets zu bedenken, dass die Abscheidung der Harnsäure aus Harn durch die zu beschreibenden Methoden nicht absolut quantitativ ist und dass der der Abscheidungsmethode als solcher zukommende Fehler unter Umständen nicht konstant sein muss.

### 1. Nach Ludwig.

A. Prinzip. Aus einer verdünnten Uratlösung wird die Harnsäure bei Gegenwart von Neutralsalz oder einer ammoniakalischen Magnesialösung durch eine ammoniakalische Silberlösung als Verbindung mit Silber und einem zweiten Metall bis auf Spuren gefällt (S. 1021). Beim Behandeln des Niederschlags mit Alkali-

Sulphydratlösung geht die Harnsäure als Alkalisalz wieder in Lösung, und nach dem Eindampfen der angesäuerten Lösung krystallisiert die Harnsäure aus. Sie wird auf einem Filter gesammelt und gewogen. Weil sich der gelatinöse Harnsäureniederschlag nur schwer auswaschen lässt, wird im Harn durch Zusatz von ammoniakalischer Magnesialösung ein Niederschlag von Tripelphosphat erzeugt, der sich dem Harnsäureniederschlag beimengt und ihn so lockrer macht.

Die Grundlage des Verfahrens bildet die Beobachtung von Salkowski, dass aus Harn, aus welchem die Harnsäure durch Salzsäure, soweit es eben auf diese Weise geht, ausgefällt war, ammoniakalische Silberlösung den in Lösung gebliebenen Rest Harnsäure niederschlägt. Maly hat dann nachgewiesen, dass der durch das Reagens aus Harn direkt erhaltene Niederschlag neben Silber noch Alkali und Erdalkali enthält. Auf Grund seiner Beobachtung empfahl Salkowski die Harnsäure in zwei Teilen zu bestimmen, nämlich durch Füllen nach Heintz mit Salzsäure und den in Lösung gebliebenen Rest für sich durch ammoniakalische Silberlösung. Ludwig vereinfachte das Verfahren dahin, dass die gesamte Harnsäure bloss durch ammoniakalische Silberlösung abgeschieden wurde. Ein ähnliches, aber umständlicheres Verfahren hat Salkowski später selbst mitgeteilt. Die Methode ist nach der späteren ausführlichen Beschreibung von Ludwig mit einigen von Huppert gemachten Zusätzen wiedergegeben.

### B. Erfordernisse.

1. Ammoniakalische Silberlösung. Es werden 26 g salpetersaures Silber in Wasser gelöst, die Lösung mit soviel Ammoniak versetzt, dass der anfangs entstehende braune Niederschlag von Silberoxyd wieder in Lösung geht und die Lösung mit Wasser zum Liter aufgefüllt. — Statt Silbernitrat kann man auch die entsprechende Menge Chlorsilber oder Silberoxyd in Ammoniak lösen.

2. Magnesiamischung. Man löst 100 g krystallisiertes Chlormagnesium in der genügenden Menge Wasser, setzt eine kalt gesättigte Chlorammonlösung in reichlicher Menge und darauf so viel starke Ammoniakflüssigkeit zu, dass die Mischung stark darnach riecht. Die Mischung soll klar sein; enthält sie einen flockigen Niederschlag (von Magnesiumhydrat), so wird dieser durch nachträglichen Zusatz von Chlorammonlösung oder durch Lösen von Salmiak in der Mischung auch in Lösung gebracht. Zuletzt wird auf 1 l aufgefüllt.

3. Lösung von Einfach-Schwefelkalium oder Schwefelnatrium. Es werden 15 g Kaliumhydrat oder 10 g Natriumhydrat zum Liter gelöst, die eine Hälfte der Lösung vollständig mit Schwefelwasserstoff gesättigt und mit der anderen Hälfte wieder vermischt. Das Alkalihydrat muss frei von Salpetersäure und salpetriger Säure sein; sie gelangen, an das Alkali gebunden, zuletzt in die Harnsäurelösung, und beim Ansäuern derselben mit Salzsäure werden diese Säuren sowie Chlor frei, und Harnsäure zerstört. Am besten bereitet man das Sulphydrat daher aus Natrium hydricum e natrio. Die Lösung zersetzt sich in Berührung mit Luft allmählich und enthält zuletzt kein Sulphydrat mehr.

Die angegebene Konzentration der drei Reagentien ist so gewählt, dass je 10 ccm derselben für 100 ccm Harn vollständig ausreichen, um einerseits alle Phosphorsäure und alle Harnsäure zu fällen und andererseits aus dem Niederschlage alle Harnsäure in Lösung zu bringen, selbst wenn der Harn überaus reich an Harnsäure ist.

Denigès<sup>1)</sup> vereinigt die Silberlösung mit der Magnesiamischung. Es werden 150 g Salmiak und 100 g Chlormagnesium zusammen in 20 proz. Ammoniak gelöst, die Lösung mit Ammoniak auf 1 Liter aufgefüllt und filtriert. Ein Volumen dieser mischt man mit dem gleichen Volumen einer  $\frac{1}{10}$  n-Silberlösung (mit 17 g Silbernitrat im Liter). Von dieser Mischung genügen 25 ccm, um die Harnsäure aus 100 ccm Harn abzuscheiden.

<sup>1)</sup> G. Denigès, Bull. de la Soc. chim. [3] 11. 226. 1894.



C. Ausführung. Es werden 100 oder 200 ccm Harn in ein Becherglas gemessen. In einem anderen Becherglas werden auf 100 ccm Harn 10 ccm der Silberlösung (1) mit 10 ccm der Magnesiamischung (2) gemischt und der entstandene Niederschlag von Chlorsilber wieder in Ammoniak gelöst; ein sich dabei etwa bildender flockiger Niederschlag von Magnesiumhydrat bleibt unberücksichtigt. Diese Mischung giesst man unter Umrühren in den Harn, lässt den entstandenen Niederschlag sich einigermassen absetzen, filtriert ihn dann auf einem Saugfilter (von 10 cm Durchmesser) ab und wäscht ihn noch 2—3 mal mit Wasser, dem einige Tropfen Ammoniak zugesetzt sind, nach. Die Waschflüssigkeit benutzt man gleichzeitig zur Ausspülung des Becherglases, aus dem man aber nicht jeden Rest des Niederschlags auf das Filter zu bringen nötig hat. Man saugt alle Flüssigkeit vom Filter ab. Sobald der Niederschlag rissig geworden ist, löst man ihn mit einem Glasstab vom Filter ab und bringt ihn in das Becherglas zurück. Das Filter muss dabei ganz bleiben. Das Ablösen des halb trocknen Niederschlags vom Filter gelingt leicht in der Weise, dass man den Glasstab auf dem Filter entlang rollt. Die noch im Filter befindlichen Reste des Niederschlags werden möglichst vollständig gleichfalls in das Becherglas gespritzt.

Es werden dann 10 ccm der Schwefelkalilösung (3) mit ungefähr dem gleichen Volumen Wasser verdünnt und zum Kochen erhitzt. Mit dieser Flüssigkeit bespült man das Filter und lässt sie in das unter den Trichter gestellte Becherglas mit dem Niederschlag ablaufen. Man zerteilt den Niederschlag mit einem Glasstab möglichst fein, erhitzt über freier Flamme bis gerade zum Sieden oder stellt das Becherglas eine Zeitlang in kochendes Wasser. Ein zu langes Erhitzen bedingt einen Verlust an Harnsäure. Nachdem man sich überzeugt hat, dass der ganze Niederschlag durchaus schwarz geworden ist und keine unveränderten grauen oder gelben Teile mehr enthält, filtriert man durch das bereits benutzte Filter in eine Schale und wäscht den Niederschlag gut (bis zum Verschwinden der alkalischen Reaktion) mit heissem Wasser aus. Das Filtrat wird alsdann mit Salzsäure angesäuert, wozu 5 ccm einer auf das 4 fache verdünnten Säure von 1,12 Dichte genügen und auf 10—15 ccm eingedampft. Nach dem Erkalten krystallisiert die Harnsäure vollends aus. Ludwig hält ein einstündiges Stehen der erkalteten Flüssigkeit dazu für genügend; ein längeres Zuwarten ist auf keinen Fall unvorteilhaft.

Um den Verlust zu vermeiden, welcher bei der Einwirkung der alkalischen Sulfhydratlösung in der Wärme eintreten kann, schüttelt Hopkins<sup>1)</sup> den Niederschlag in der Kälte tüchtig mit dem Sulfhydrat, erhitzt gerade bis zum Sieden und filtriert.

Man darf nicht zur Trockne eindampfen, weil sonst die Harnsäure feinpulverig ausfällt und sich dann schwer abfiltrieren lässt; ausserdem könnte sich wieder harnsaures Salz bilden und dieses der Bestimmung entgehen.

<sup>1)</sup> F. G. Hopkins, Proceed. of the roy. Soc. 52. 97. 1892.



Die Menge der ausgeschiedenen Harnsäure lässt sich in verschiedener Weise bestimmen. Um sie zu wägen, bringt man sie nach Ludwig auf ein bei 110° getrocknetes Glaswollfilter, indem man das Filtrat zum Nachspülen der Schale so oft verwendet, bis sich alle Krystalle auf dem Filter befinden, saugt die Mutterlauge unter schwachem Druck ab und wäscht das Filter immer nur mit kleinen Mengen Wasser chlorfrei. Neben der Harnsäure befindet sich auf dem Filter noch Schwefel, welcher sich aus dem Schwefelkali bei Zusatz der Säure abgeschieden hat und der vor dem Wägen entfernt werden muss. Zu diesem Zwecke trocknet man das Filter, spült es nach dem Erkalten (3mal) mit Schwefelkohlenstoff durch und verdrängt den Schwefelkohlenstoff zuletzt sofort durch Äther. Das Filter wird dann wieder bei 110° getrocknet und nach dem Erkalten im Exsikkator gewogen. In der Regel genügt ein einstündiges Verweilen des Filters im Trockenkasten zur Herstellung der Gewichtskonstanz. Statt der Glaswolle lässt sich zum Füllen des Trichters auch mit Salzsäure ausgekochte und wieder säurefrei gewaschene Asbestwolle verwenden.

Nach diesem Verfahren erhielt Ludwig bei Versuchen mit reiner Harnsäure im Mittel 98% derselben wieder.

Enthält der Harn ein Harnsäuresediment, so löst man dieses vor dem Abmessen des Harns durch Erwärmen im Harn auf. Oder man löst es durch Erwärmen in möglichst wenig Natronlauge und mischt die Lösung mit dem Harn. Ein dabei entstehender Phosphatniederschlag hat nicht viel auf sich; im Notfalle kann man, wenn er so stark ist, dass der Tripelphosphatniederschlag später zu schwach wäre, der Mischung noch Natronphosphat zusetzen. Sehr rätlich ist auch, um die Bildung eines Uratsediments zu verhindern, den Harn in einem etwas kohlensaures Natron enthaltenden Gefäss zu sammeln.

Pepton und Propepton beeinträchtigen nach Stadthagen die Fällung der Harnsäure nicht. Dagegen muss das Eiweiss vorher entfernt werden. Ludwig verfährt dazu nach S. 1023, filtriert durch ein Leinwand- oder Papierfilter und wäscht das Coagulum gut aus. Es wird dabei eine unbedeutende Menge Harnsäure weniger gefunden als in eiweissfreiem Harn.

Ist die Harnsäure stark gefärbt oder scheidet sich neben ihr noch Schwefelsilber ab, wie manchmal geschieht, so löst man sie in der Wärme in reiner (nitrat- und nitritfreier) Natron- oder Kalilauge filtriert, wäscht aus, säuert das Filtrat mit Salzsäure an und verdampft zur Krystallisation. Dabei erleidet man aber nicht unerhebliche Verluste an Harnsäure. Um diese zu vermeiden und das lästige Wegwaschen des Schwefels zu umgehen, zersetzt Groves den Silberniederschlag statt mit Schwefelalkali mit einer äquivalenten Lösung von Jodkalium. Die Harnsäure färbt sich dabei aber leicht gelb und nach Hopkins<sup>1)</sup> wird durch frei werdendes Jod ein Teil der Harnsäure zerstört.

Deroide<sup>2)</sup> will die Harnsäure vom Schwefel in der Weise trennen, dass er sogleich nach Zusatz von Salzsäure zu dem alkalischen Filtrat durch ein kleines glattes Filter filtriert und mit heissem Wasser nachwäscht. Der Schwefel scheidet sich aber erst vollständig beim Erwärmen der angesäuerten Flüssigkeit aus und schon vorher kann auf dem Filter Harnsäure auskrystallisieren.

Das Sammeln der Harnsäure auf Filtern von Glas- oder Asbestwolle hat etwas Missliches, weil sie sich schwer dicht herstellen lassen

<sup>1)</sup> E. W. Groves, Journ. of Physiol. 12. 484. 1891. — Hopkins, a. a. O.

<sup>2)</sup> E. Deroide, Contribution à l'étude des procédés de dosage de l'acide urique. Lille 1891. 28.

oder, wenn sie zu dicht ausgefallen sind, das Filtrieren erschweren. Papierfilter, deren sich Groves sowie Geelmuyden bedienen, behalten bei wiederholtem Trocknen und namentlich nach der Behandlung mit Säure kein konstantes Gewicht. Hopkins hat vorgeschlagen, die Harnsäure auf einem gehärteten Filter auszuwaschen, sie dann vom Filter auf eine gewogene Schale zu spritzen, was bei der Glätte des Filters leicht möglich ist, sie bei  $110^{\circ}$  zu trocknen und zu wägen.

Einige (Ebstein, Bödtker, Geelmuyden) haben mit der Harnsäure eine Stickstoffbestimmung nach Kjeldahl ausgeführt. Durch Multiplikation des gefundenen Stickstoffs mit 3 erfährt man die Menge der Harnsäure.

Die Säure wird auf einem kleinen Papierfilter ausgewaschen und dann samt dem Filter oxydiert, wozu man 10 ccm Schwefelsäure, 5 g Kaliumsulfat und 0,5—1 g Kupfersulfat braucht. — Geelmuyden <sup>1)</sup> fand durch die Stickstoffbestimmung im Mittel von 14 Bestimmungen 9,36 % weniger als durch Wägen auf einem Papierfilter, hält aber die nach Kjeldahl erhaltenen Resultate für die richtigeren.

Noch einfacher lässt sich die Harnsäure nach einer der unter I. 1., 2. oder 3. c. ausgeführten Methoden bestimmen. Für das Titrieren mit Piperidin (I. 1.) muss die Harnsäure völlig säurefrei gewaschen werden, bei den beiden anderen Methoden ist dieses nicht unbedingt nötig. Die Harnsäure wird vom Filter abgespritzt und für den Versuch verwendet.

Im Menschenharn liefert diese Methode befriedigende Resultate, wenn es auch mitunter vorkommt, daß Parallelbestimmungen aus unauffindbaren Ursachen mit einem bestimmten Harn immer wieder unbefriedigende Übereinstimmung zeigen. Im Harn von Hunden und Kaninchen, sowie von Katzen, in welchem allermeist sehr wenig Harnsäure vorhanden ist, erhält man nach dieser Methode sehr häufig überhaupt keine Fällung mit ammoniakalischer Silberlösung und Magnesiainmischung, in anderen Fällen tritt sie sehr verspätet ein, die ganze Flüssigkeit schwärzt sich infolge von weitgehender Reduktion des Silbersalzes und aus dem minimalen, nach mühsamer, nicht endenwollender Filtration erhaltenen Niederschlag erhält man nach dem Behandeln mit Sulphydrat und Ansäuern des Filtrats auch nach langem Stehenlassen der eingeeengten Flüssigkeit keine Harnsäurekrystallisation, sondern höchstens eine amorphe, flockige, braune Abscheidung. Nichtsdestoweniger ist in allen diesen Harnen Harnsäure vorhanden und lässt sich auch mittelst einer etwas modifizierten Methodik durch das Silberverfahren gewinnen. Die Ursache für das Misslingen der Bestimmung, wenn man sich an die oben gegebene Originalvorschrift hält, liegt einerseits darin, dass die Zerlegung des Silberniederschlags durch Alkalisulphydrat mit um so grösseren Verlusten an Harnsäure verbunden zu sein scheint, je weniger Harnsäure zugegen ist, andererseits darin, dass offenbar die quantitative Fällung durch irgendwelche Substanzen gehemmt ist. Schliesslich kommt noch dazu, dass man die Harnsäure etwa enthaltenden salzsauren Filtrate nicht exzessiv einengen kann, weil schon vorher die anwesenden anorganischen Salze (NaCl) auszukrystallisieren beginnen.

Den letzteren Nachteil habe ich dadurch umgangen, dass ich zunächst nach dem Verfahren von Camerer-Arnstein durch Zugabe von Magnesiainmischung und Ammoniak die Phosphate ausfällt und

<sup>1)</sup> H. Chr. Geelmuyden, Zeitschr. f. analyt. Ch. **31**. 160. 1892.

in deren Filtrat erst mit ammoniakalischer Silberlösung die Purinstoffe niederschlug. Gibt man einen reichlichen Überschuss von Magnesia zu, so wird man viel seltener durch Reduktion gestört. Nach der Zugabe der Silberlösung muss man meist 24 Stunden warten. Der Niederschlag bildet sich nur langsam. Man stellt daher die Probe am besten in das Dunkelmzimmer oder bedeckt sie mit einer schwarzen Glocke. Den auf dem Filter gesammelten und gewaschenen Niederschlag zerlege ich mit dem Filter durch Schwefelwasserstoff, um die Zersetzungsmöglichkeit durch freies Alkali zu vermeiden und um später keine Salze in der Harnsäuremutterlauge zu haben. Dabei scheidet sich das Silbersulfür in der überwiegenden Mehrzahl der Fälle kolloid ab und lässt sich nicht durch Filtration trennen. Trocknet man jedoch die ganze Flüssigkeit auf dem Wasserbade ein, so flockt das Schwefelsilber aus und man kann dem trockenen Rückstand meist ohne kolloide Lösung des Silbersulfids die nun als Magnesiumsalz vorhandene Harnsäure durch heisses Wasser entziehen. Nur wenn sehr viel Farbstoff mit gefällt war, geht etwas Silbersulfid kolloid in Lösung, es ist dann zweckmässig, die ganze Prozedur (d. h. die Fällung mit Magnesia und Silber) zu wiederholen, wobei dann die Harnsäure mit geringerer Verunreinigung durch Farbstoff abgeschieden wird und die Gewinnung der Lösung von Magnesiumurat in reiner Form möglich ist. Ich habe mich durch öftere Prüfung des zurückbleibenden Silbersulfids überzeugt, dass auch bei Anwesenheit von viel Harnsäure (Menschenharn) keine Harnsäure der Lösung entgeht, wenn man etwa 6 mal den Rückstand mit kochendem Wasser digeriert. Das Filtrat kann man dann beliebig weit einengen. Anorganische Salze sind keine zugegen, die das weitere Vorgehen durch Auskrystallisieren stören könnten. —

Die die Fällung der Purinstoffe hemmenden Substanzen des Hundes etc. Harns entferne ich vor der Fällung der Phosphate durch verdünnte Phosphorwolframsäurelösung. Das Verfahren gründet sich auf das oben S. 1023 mitgeteilte Verhalten der Harnsäure zu Phosphorwolframsäure in grosser Verdünnung und bei Anwesenheit von durch das Reagens leichter fällbaren Stoffen. Es wird nur so viel einer 1%igen Phosphorwolframsäurelösung zugesetzt, dass im Filtrat keine Phosphorwolframsäure nachweisbar ist. Hierbei fällt, wie Versuche mit Menschenharn ergeben haben, auch bei Anwesenheit von viel Harnsäure nichts von derselben aus, wenn man sogleich filtriert. Durch die vorherige Fällung des Harns mit Phosphorwolframsäure werden alle späteren Filtrationen auch wesentlich erleichtert. Ich beschreibe die Methode im folgenden zum ersten Male auf Grund zahlreicher Analysen im Hunde- und Kaninchenharn. Beweisend für ihre Zuverlässigkeit waren mir besonders jene nicht seltenen Fälle, in denen die originale Ludwig'sche Methode überhaupt keinen Purinniederschlag ergab, während derselbe Harn nach der Behandlung mit Phosphorwolframsäure eine deutliche Fällung mit dem Silberreagens aufwies, aus welcher sich auch stets wohlkrystallisierte Harnsäure darstellen liess.



## Ausführung nach Wiechowski.

Harnsäurereiche Harne werden vor der Inarbeitnahme auf einen Gehalt von annähernd 1 U.:2000 verdünnt, mit 1% einer Salzsäure von 1,19 sp. G. versetzt und in Proben von je 2 ccm diejenige grösste Menge einer 1%igen Phosphorwolframsäure ausgetastet, bei deren Verwendung im Filtrate von der braunen flockigen Fällung keine Phosphorwolframsäure nachweisbar ist. Als Reagens auf Phosphorwolframsäure kann man entweder den in Arbeit befindlichen Harn selbst oder eine 5%ige Lösung von Chininhydrochlorid (Bass) verwenden. Das Filtrat darf weder durch das eine oder andere Reagens im geringsten getrübt werden. Nach dem Ausfall dieser Vorprüfung berechnet man diejenige Menge der 1%igen Phosphorwolframsäure, welche man dem in Arbeit zu nehmenden Harnvolumen zuzusetzen hat, wobei man eher zu wenig als zu viel zusetzt. Nun wird mit Wasser auf ein rundes Volumen aufgefüllt und sofort durch ein Faltenfilter filtriert. Die Filtration geht sehr flott vonstatten. Das Filtrat wird gemessen, mit Ammoniak alkalisch gemacht und nach der Vorschrift von Camerer (s. S. 941) mit Magnesiamixtur behandelt. Man füllt wieder auf ein rundes Volumen auf und filtriert sofort wieder durch ein Faltenfilter das ausgefällte Tripelphosphat ab. Ein gemessener Teil des Filtrats wird nun mit Silberlösung gefällt. Die Silbermagnesiaverbindung der Harnsäure ist zwar auch in starkem Ammoniak unlöslich, man wird aber — da ja meist auch die Bestimmung der Basen in der Mutterlauge der Harnsäure beabsichtigt ist — zweckmässig von den oben S. 942 erwähnten Beobachtungen von Bass Gebrauch machen und durch Verwendung von gewöhnlicher, nicht ammoniakalischer Silbernitratlösung den Ammoniaküberschuss, der zur völligen und raschen Ausfällung der Phosphate nötig war, abstumpfen. Man soll jedoch nicht so viel Silbernitratlösung zusetzen, dass Chlorsilber ausfällt. Dieses muss auf alle Fälle vermieden werden, wenn man den Niederschlag nach der Behandlung mit Schwefelwasserstoff zur Trockne bringen will. Hat man aus irgend einem Grunde vorgezogen, soviel Silbernitratlösung zuzusetzen, dass dem Purinniederschlag Chlorsilber beigemischt ist, oder ist man im Zweifel, ob solches der Fall ist, so verfährt man weiter nach b. Man kann aber auf alle Fälle bei der Fällung mit ammoniakalischer Silberlösung bleiben, weil der durch einen Ammoniaküberschuss etwa bedingte Fehler bei der etwa nachträglich geplanten Bestimmung der Basen im Harn wenigstens ganz unbedeutend ist. Jedemfalls soll aber die Silberlösung genau nach den Vorschriften von Ludwig hergestellt sein, d. h. nicht mehr Ammoniak enthalten, als zur Lösung des zuerst ausfallenden Silberoxyds nötig ist.

a) Der Purinniederschlag enthält kein Silberchlorid, er ist durch ammoniakalische Silberlösung gewonnen. Man bringt ihn auf ein Faltenfilter und wäscht ihn zunächst mit Ammoniakwasser (1% der käuflichen konzentrierten Lösung) silberfrei. Hierauf bringt man das Filter



samt dem Niederschlag in einen Erlenmeyerkolben von passender Grösse, setzt Wasser zu, verschliesst mit einem Kautschukstopfen und schüttelt kräftig bis zur völligen homogenen Verteilung des Filters. Man spült dann den Stopfen gut in dem Kolben ab und leitet bis zur völligen Zersetzung des Niederschlages  $H_2S$  ein. Hierauf spült man den Kolbeninhalt quantitativ in eine geradwandige Krystallisierschale und verdampft auf dem Wasserbade zur Trockne. Dann übergiesst man den Rückstand mit heissem Wasser und digeriert kurze Zeit auf dem kochenden Wasserbade, ehe man durch ein kleines Filter filtriert. Die Filtration geht in den allermeisten Fällen glatt vonstatten, das ursprünglich kolloid abgeschiedene Silbersulfid ist durch das Eindampfen zur Trockne ausgeflockt. Sollte jedoch beim Waschen wieder kolloide Lösung eintreten, so kann man Filtrat und Waschwasser noch einmal zur Trockne bringen, wobei dann der durchs Filter gegangene Rest endgültig ausflockt, und den Rückstand nun noch einmal mit heissem Wasser behandeln und filtrieren. Ist jedoch sehr viel Farbstoff mit ausgefallen, so behält das Silbersulfid die Neigung, kolloid zu bleiben. Man tut in einem solchen Falle am besten, die durch das kolloide Silbersulfid braun bis schwarz gefärbte Flüssigkeit noch einmal mit einem klaren Gemisch von ammoniakalischer Silberlösung und Magnesiamixtur zu fällen und mit der Fällung den Gang noch einmal zu wiederholen. Jetzt kommt man sicher zu einem klaren Filtrate, welches die gesamte Harnsäure als Magnesiumsalz enthält.

b) Ist im Niederschlag Chlorsilber enthalten oder wenigstens der Verdacht auf dessen Anwesenheit vorhanden, so bringt man den gewaschenen Niederschlag mit Wasser und etwas Kupferacetatlösung samt dem Filter in einen Erlenmeyerkolben, verteilt ihn wie bei a), erhitzt aber vor dem Einleiten von Schwefelwasserstoff zum Sieden. Bei Anwesenheit von viel Wasser (200 ccm) kocht man nach dem völligen Zerlegen des Purinniederschlags solange weiter, bis aller Schwefelwasserstoff entfernt ist und ein in die Dämpfe gehaltenes, mit Bleizuckerlösung befeuchtetes Papier nicht gebräunt wird. Dann filtriert man möglichst rasch, am besten auf einer Nutsche, und wäscht mit heissem Wasser gründlich aus. Das Filtrat enthält infolge des gleichzeitig ausgefallenen Kupfersulfids kein kolloides Silbersulfid, es ist in gelungenen Fällen blank.

Die nach a) oder b) erhaltenen Filtrate, welche stets ganz klar sein sollen, werden nach Zusatz einer geringen Menge konzentrierter Salzsäure in einer geradwandigen Krystallisierschale von passender Grösse, welche das bei Verwendung runder Krystallisierschalen unausbleibliche vorzeitige Eintrocknen der Randpartien der Lösung vermeidet, auf ein möglichst kleines Volumen eindampft. Um in Fällen, wo wenig Harnsäure in einem grossen Volumen vorhanden und daher die Verwendung einer grossen Schale zum Eindampfen nötig war, auf das nötige kleine Volumen zu kommen, ist es gut, nach dem Einengen in eine nun

möglichst klein zu wählende Schale zu überspülen und weiter einzudampfen. Ist sehr wenig Harnsäure zugegen, so fällt erst nach längerem Stehen in dem auf 1 cm und weniger eingengten Filtrate die Harnsäure aus. Man lässt daher bedeckt mindestens 24 Stunden stehen. Die mikroskopische Untersuchung der erfolgten Abscheidung in der Krystallisierschale selbst, die immer vorgenommen werden sollte, ergibt in den meisten Fällen die charakteristischen Formen der Harnsäure ohne fremde Beimengung. Waren die Krystalle erst in der Kälte ausgefallen, so zeigen sie oft das glasklardurchsichtige Verhalten, welches wohl auf einen Gehalt an Krystallwasser zurückzuführen ist. Erhitzt man nur kurz auf dem Wasserbade, so werden die Krystalle sehr schnell opak und erscheinen dann in der gefärbten Mutterlauge bei Beobachtung mit dem unbewaffneten Auge fast weiss. Sie sind aber fast immer stark gefärbt.

Die Trennung der ausgeschiedenen Harnsäure von der Mutterlauge und ihre Messung kann wie oben erfolgen. Ich ziehe es vor, die Krystalle mit ihrer Mutterlauge auf einen Gooch- oder Neubauertiegel zu bringen und vor der Pumpe mit verdünnter Schwefelsäure salzsäurefrei und dann weiter je sechsmal mit Alkohol und Äther zu waschen. Eine Stunde Trocknung bei 80° genügt zur Erzielung der Gewichtskonstanz. Die Grösse der für die Löslichkeit der Harnsäure in der Mutterlauge und in der Waschflüssigkeit anzubringenden Korrektur ist unsicher. Daher wäre es von Vorteil, wenn man das Verfahren von Kóssa (S. 1065) in Anwendung bringen könnte: Verdampfen zur Trockne, Lösen in warmer konzentrierter Schwefelsäure (eventuell Filtrieren durch Asbest) und Fällen mit Alkohol. Über die Brauchbarkeit dieses für die Bestimmung der Harnsäure im Vogelharn angegebenen Verfahrens für den Säugetierharn habe ich noch keine Erfahrungen. Wenn die Purinbasen hierbei nicht mit gefällt werden, so wäre es die beste Abscheidungsform der Harnsäure zur Wägung; da in der Mutterlauge und in dem Waschalkohol keine Harnsäure gelöst bleibt, so fällt jede Korrektur der durch die Wägung gewonnenen Zahl fort und man hat den Vorteil, an der Hand der Wage bis zur völligen Reinheit, d. h. bis zur Gewichtskonstanz zu waschen.

## 2. Nach Krüger und Schmid.

Prinzip, Erfordernisse und Ausführung sind bereits S. 927 angegeben worden. Dem dort Gesagten ist nur hinzuzufügen, dass man das Filtrat vom Kupfersulfür ebenso behandelt wie die Filtrate vom Silbersulfür bei der Ludwigschen Methode, d. h. man engt mit Salzsäure ein und trennt die ausgefallene Harnsäure wie oben von der Mutterlauge. Die Messung der abgeschiedenen Harnsäure kann in einer der unter I beschriebenen Methoden oder in der zuletzt beschriebenen Weise vorgenommen werden. Ganz besonders sei auf die Zusätze, welche Benedikt und Saiki sowie Schittenhelm zu dieser Methode gemacht haben, S. 928, hingewiesen.

3. Nach Hopkins<sup>1)</sup>.

A. Prinzip. Das Verfahren ist aus dem von Fokker angegebenen hervorgegangen, bei welchem der Harn mit einer beschränkten Menge Salmiaklösung versetzt wird, um die Harnsäure als Ammonurat abzuscheiden. Die Fällung ist aber dabei eine unvollständige. Völlig unlöslich ist dagegen, wie Hopkins gezeigt hat, das Ammonurat in einer ganz oder nahezu ganz gesättigten Chlorammonlösung. Aus dem Ammonsalz kann die Harnsäure durch Salzsäure abgeschieden und ihre Menge durch Wägen oder Titrieren bestimmt werden; auch lässt sich das Ammonurat direkt titrieren.

Andere Ammonsalze fällen die Harnsäure auch, aber, nach Hopkins, nicht so gut als Salmiak; bei Verwendung von Ammonsulfat ist die Fällung nach Edmunds<sup>2)</sup> erst in einigen Tagen vollendet.

Reine Harnsäure fand Hopkins bei seinen Bestimmungen durch Wägen bis auf 1 % wieder; von 0,1 g fehlte 1 mg. Aus Harn fällt beim Sättigen desselben mit Salmiak die Harnsäure so vollständig, dass man im Filtrat auf keine Weise Harnsäure auffinden kann, und die Abweichung der Bestimmung der Harnsäure im Harn (durch Wägen) braucht von der nach Ludwig 1 % nicht zu überschreiten.

Ausser der Harnsäure werden nach Hopkins noch Farbstoffe und Xanthin gefällt, Hypoxanthin und Kreatin dagegen nicht. Bei der Zerlegung des Ammonurats mit Salzsäure wird das Xanthin ganz und der Farbstoff grösstenteils entfernt. Sie beeinträchtigen also die Bestimmung durch Wägen und Titrieren nicht, bei der Titrierung des Ammonurats kann aber nach Hopkins das Xanthin einen Fehler veranlassen. Doch kann der durch die Gegenwart des Xanthins im Salmiakniederschlag bedingte Fehler, wenn er überhaupt besteht, nur sehr gering sein, da Ritter<sup>3)</sup> im Mittel auf sieben Bestimmungen durch Titrieren des Ammonurats aus Harn mit Permanganat nur 0,7 % mehr Harnsäure fand, als durch Wägen und bei der Bestimmung reiner Harnsäure diese Abweichung 1,5 % betrug. Der Unterschied lässt sich zwanglos aus einem Verlust an Harnsäure beim Auswaschen derselben erklären. Die ausgewaschene Harnsäure enthält nach Hopkins nur eine Spur unverbrennliche Substanz.

Eiweiss scheint keinen oder nur einen geringen Einfluss auf die Genauigkeit der Bestimmung zu haben; es wird durch den Salmiak nur unvollständig gefällt und das etwa niedergeschlagene Eiweiss wird bei der Behandlung des Niederschlags mit Salzsäure und beim Auswaschen entfernt. Gallenfarbstoff wird zwar mit gefällt, aber der Fehler ist nach Hopkins schliesslich doch nur gering.

## B. Erfordernisse.

1. Reines Chlorammon. Der Salmiak, welcher bei der Wägungsbestimmung der Harnsäure verwendet werden soll, darf nichts Unlösliches enthalten. Die Lösung des Salzes muss filtriert und durch Eindampfen zum Krystallisieren gebracht werden. Soll das Ammonurat (mit Permanganat) titriert werden, so muss das Ammonsalz frei sein von Ferrosalz, welches es in der Regel enthält.

2. Reines Ammonsulfat. Dasselbe dient zum Wegwaschen des Chlorammons, wenn das Ammonurat als solches titriert werden soll. Es darf kein Ferrosalz und Chlor nur in Spuren enthalten. Vom Chlor befreit man es durch Um-

<sup>1)</sup> F. Gowland Hopkins, Guys Hospital Reports 48. 299. 1891; Zentralblatt f. d. med. Wissensch. 1892. 931. — Proceedings of the London roy. Soc. 52. 93. 1892; Chem. Zentralbl. 1892. 2. 269. — The Journal of Pathology and Bacteriology 1. 451. 1893.

<sup>2)</sup> A. Edmunds, Journ. of Physiol. 17. 452. 1895.

<sup>3)</sup> G. v. Ritter, Zeitschr. f. physiol. Ch. 21. 291. 1895.



krystallisieren. Um das Ferrosalz zu entfernen, lässt man die Lösung des Ammonsulfats nach Zusatz einer reichlichen Menge von Schwefelammon in einer verschlossenen Flasche stehen, bis sich das Schwefeleisen am Boden abgesetzt hat, filtriert dann und dampft zur Krystallisation ein. Filtriert man, wenn das Schwefeleisen noch suspendiert ist, so geht es mit durch das Filter. Das Salz muss zur Entfernung ausgeschiedenen Schwefels noch umkrystallisiert werden und bei dieser Gelegenheit entfernt man zugleich das Chlor. Die Lösung braucht nur zu 0,9 gesättigt zu sein; um diese Lösung zu erhalten, mischt man 9 Vol. der ganz gesättigten Lösung mit 1 Vol. Wasser.

Das Chlorammon befreit man vom Ferrosalz ebenso wie das Ammonsulfat, oder man versetzt die Lösung mit Chlorwasser, macht mit Ammoniak alkalisch und filtriert, wenn sich das gebildete Eisenoxyd abgeschieden hat. Dieses Verfahren ist für die Reinigung des Ammonsulfats nicht verwendbar, da dieses chlorfrei sein soll.

### C. Ausführung.

In 100 ccm Harn werden 30 g Salmiak in der Kälte gelöst. Die anfangs gleichmässig trübe Flüssigkeit klärt sich beim Stehen in dem Masse, als sich das Ammonurat absetzt. Der Niederschlag kann schon 2 Stunden nach Herstellung der Lösung filtriert werden. Man bringt ihn auf ein kleines Filter, wäscht ihn 3—4 mal mit einer gesättigten Chlorammonlösung nach, die man zugleich zum Nachspülen des Becherglases benutzt. Dann spritzt man den Niederschlag vom Filter und den etwa noch im Becherglas befindlichen Rest mit Wasser in eine kleine Schale, erhitzt bis zum Sieden und setzt einige ccm konzentrierter Salzsäure zu. Das Urat geht dabei vollständig in Lösung und beim Erkalten krystallisiert die Harnsäure aus. Macht die Flüssigkeit mehr als 20—30 ccm aus, so dampft man sie vor dem Zusatz der Salzsäure auf ungefähr dieses Volumen ein. Nach 2 stündigem Stehen der mit Salzsäure vermischten Flüssigkeit kann die Harnsäure abfiltriert werden.

Zur Sättigung von 100 ccm Wasser sind bei 15° 35,3, bis 20° 37,3 g Salmiak erforderlich; die 30 g Salmiak, welche man in 100 ccm Harn lösen soll, genügen aber zur vollständigen Abscheidung der Harnsäure. Man kommt schneller und sicherer zum Ziele, wenn man die erforderliche Menge Salmiak abwägt, als wenn man den Harn mit ungewogenen Mengen Salmiak zu sättigen versucht. Auch ist es vorteilhaft, den Salmiak fein zu pulvern. Nach zweistündigem Stehen der Lösung ist alles Ammonurat ausgefallen; das Filtrat bleibt wochenlang klar. Ist man verhindert, den Niederschlag bald abzufiltrieren, so kann man ihn mit etwas Phenol versetzen, um die das Filtrieren erschwerende Verpilzung zu verhindern. Das Filtrat soll völlig klar und glänzend sein; geht es trübe durch das Filter, so kann man versuchen, es durch wiederholtes Aufgiessen auf dasselbe Filter zu klären, doch gelingt das nicht immer.

Ein Zusatz von Ammoniak beschleunigt die Abscheidung des Ammonurats; doch darf man das Ammoniak erst nach dem Auflösen des Salmiaks hinzufügen, weil sonst Erdalkaliphosphat gallertig ausfällt, welches das Filtrieren verhindert. Aus dem mit Salmiak gesättigten Harn scheidet das Ammoniak nur spärliche, für das Filtrieren belanglose Tripelphosphatkrystalle ab. Auch Crouson und Vilaret halten bei der Fällung des Ammonurats die alkalische Reaktion für nötig <sup>1)</sup>.

Enthält die abgemessene Harnmenge ein Uratsediment, so ändert dieser Umstand nichts an dem Verfahren. Ein geringes Phosphatsediment lässt man unberücksichtigt, ein sehr grosses soll nach Hopkins abfiltriert und mit heissem Wasser gewaschen werden.

<sup>1)</sup> Aly Zaky, C. r. soc. biol. 53. 830. 1901.



Ist das Ammonurat stark gefärbt, so muss es in Gegenwart von Alkohol zerlegt werden. Man spült das Urat mit halbverdünntem rektifizierten Weingeist vom Filter in ein Becherglas, setzt Salzsäure zu, erhitzt zum Kochen und lässt das mit einem Uhrglas bedeckte Becherglas noch einige Zeit auf einem Wasserbad stehen; die Harnsäure muss darauf gut ausgewaschen werden.

Die ausgeschiedene Harnsäure sammelt man, wie bei II. 1. entweder auf einem Glaswoll- oder Asbestfilter, wäscht sie aus, trocknet und wägt sie mit dem Filter; oder man sammelt sie auf einem gehärteten Filter, spült sie nach dem Waschen in eine Schale, trocknet und wägt. Für je 15 ccm Mutterlauge zählt man der gewogenen Harnsäure 1 mg zu; für das Waschwasser ist dagegen nach Hopkins eine solche Korrektur nicht nötig.

Die Harnsäure lässt sich auch nach einer der unter I. 1., 2. oder 3. c. beschriebenen Arten titrieren; für die acidimetrische Bestimmung (1.) muss die Harnsäure vorher von der Salzsäure frei gewaschen werden. Die Titrierung mit Permanganat (I. 2.), sowie die mittelst Cyankalium (I. 3. c.) lässt sich auch direkt auf das Ammonurat anwenden, so dass man die Reindarstellung der Harnsäure ersparen kann. Hopkins hat die Titrierung mit Permanganat für klinische Zwecke vorgeschlagen, v. Ritter<sup>1)</sup> hat aber nachgewiesen, dass dieses Verfahren ebenso genaue Resultate liefert, wie die Bestimmung der Harnsäure als solche, und dass es also allgemein anwendbar ist. Das Ammonurat muss dazu frei von Chlorid gewaschen werden, weil Salzsäure durch das Permanganat gleichfalls oxydiert wird.

Man wäscht mit der zu 0,9 gesättigten Ammonsulfatlösung (B. 2.). Das Auswaschen auf einem Papierfilter nimmt nach v. Ritter zwei Tage in Anspruch und man sollte daher Glaswollfilter anwenden, bei denen man aber wieder sehr leicht Gefahr läuft, Harnsäure zu verlieren. Die schädliche Wirkung der Salzsäure auf das Permanganat durch Zusatz von Manganosalz zu beseitigen, hat sich nach v. Ritter in diesem Falle nicht bewährt.

Für das Titrieren nach dem Cyankaliumverfahren braucht das Ammonurat nicht chlorfrei gewaschen zu werden; dieses Verfahren führt daher am schnellsten zum Ziel.

#### Ausführung nach Folin und Shaffer<sup>2)</sup>.

A. Prinzip. Der Harn wird zunächst mit einem Reagens versetzt, welches Substanzen entfernt, die das ausfallende Ammonurat verunreinigen und indem sie ebenfalls Permanganat reduzieren, die durch Titration erhaltenen Harnsäurewerte höher ausfallen lassen als dem wirklichen Harnsäuregehalt entspricht.

B. Erfordernisse. 1. Eine Lösung, welche aus 500 g Ammonsulfat, 5 g Uranylacetat, 60 g 10%iger Essigsäure und 650 g Wasser hergestellt wird.

2. 10% Ammonsulfatlösung.

3.  $n/20$  Kaliumpermanganatlösung

C. Ausführung. 300 ccm Harn werden mit 75 ccm der Lösung 1 versetzt und nach 5 Minuten von dem entstandenen Niederschlag ab-

<sup>1)</sup> G. v. Ritter, Zeitschr. f. physiol. Ch. 21. 288.

<sup>2)</sup> Zeitschr. f. ph. Ch. 32. 552. 1901.

filtriert. Zu je 125 ccm Filtrat werden 5 ccm der gewöhnlichen Ammoniaklösung zugesetzt und die Proben bedeckt bis zum nächsten Tage stehen gelassen. Das ausgeschiedene schön krystallisierte, aber gefärbte Ammonurat wird auf einem Filter gesammelt, mit Lösung 2 chlorfrei gewaschen und in der gewöhnlichen Weise mit Permanganat titriert. Für je 100 ccm Harn sind wegen der Löslichkeit des Ammonurats 3 mg Harnsäure dem Resultate als Korrektur hinzuzählen.

#### Ausführung nach G. Guérin<sup>1)</sup>.

120—125 ccm Harn werden mit 1 g wasserfreier Soda versetzt und nach dem völligen Auflösen derselben filtriert. 100 ccm Filtrat werden dann mit 25 ccm einer Lösung versetzt, welche aus 50 g Ammonnitrat ad 100 Wasser und 5 ccm starker Ammoniaklösung besteht. Man lässt bis zum nächsten Tage stehen, filtriert das ausgeschiedene Ammonurat ab, wäscht es mit einer Lösung, welche 10 g Ammonnitrat und 1 g starkes Ammoniak in 100 Wasser enthält, chlorfrei, spült es dann mit 100 ccm Wasser in einen Erlenmeyerkolben, setzt 40 ccm 50%iger Schwefelsäure hinzu, erwärmt auf 50° und titriert mit Permanganat bis zur ersten Rosafärbung. Ein Gehalt an Eiweiss stört die Bestimmung nicht.

#### Ausführung nach Wörner<sup>2)</sup>.

150 ccm Harn werden in einem Becherglase auf 40—45° erwärmt und darin 30 g Ammonchlorid aufgelöst, nach  $\frac{1}{2}$ —1 Stunde filtriert man das ausgefallene Ammonurat ab, indem man zuerst die Krystalle auf das Filter bringt und dann erst die Mutterlauge, welche man auch zum Auswaschen des Becherglases benutzt. Man wäscht das Ammonurat auf dem Filter mit Ammonsulfatlösung chlorfrei, löst es dann in 1—2%iger Natronlauge und wäscht das Filter mit heissem Wasser gründlich aus. Filtrat und Waschwasser werden durch Erwärmen von Ammoniak befreit und, nachdem dies erreicht ist, einer N-Bestimmung nach Kjeldahl unterworfen. Die Harnsäure enthält 4 N-Atome. Eine auf N berechnet normale Harnsäurelösung enthält also  $168/4 = 42$  g Harnsäure im Liter. 1 ccm einer n/10-Lauge entspricht daher 4,2 mg Harnsäure.

Nach Lewandowski muss man auch bei der Wörnerschen Ausführungsart der Hopkinsschen Methode den Harn neutralisieren (besser alkalisch machen), weil sich sonst nicht alles Ammonurat ausscheidet.

#### Nach Dimmrock und F. Brauson<sup>4)</sup>.

100 ccm Harn werden mit 1 g Lithiumkarbonat 3 Minuten gekocht und dann filtriert. In 50 ccm des auf 50° erwärmten Filtrats werden 5 g Chlorammon gelöst und die Lösung in eine graduierte empirisch geeichte Röhre gegossen. Nach 4 Stunden liest man die Niederschlagshöhe ab und schätzt aus derselben die Menge des abgeschiedenen Ammonurats.

<sup>1)</sup> Journ. Pharm. Ch. **23**. 516. 1906.

<sup>2)</sup> Zeitschr. f. ph. Ch. **29**. 70. 1899.

<sup>3)</sup> Zeitschr. f. klin. Med. **40**. 199. 1900.

<sup>4)</sup> Brit. med. Journ. Oktober 1905. J. T. 36.

Zur Abtrennung des Ammonurats von seiner Mutterlauge bei der Hopkinsschen Methode bedienen sich Aufrecht<sup>1)</sup> und Kowarski<sup>2)</sup> nicht der Filtration, sondern der Zentrifuge.

#### 4. Als Barytsalz.

Byasson fällt die Harnsäure aus dem Harn durch ein Gemisch von Chlorbarium und Bariumhydrat und titriert die Harnsäure in schwefelsaurer Lösung mit Permanganat. Baftalowskij schlägt sie mit Bariumhydrat nieder und bestimmt im Niederschlag den Stickstoff nach Kjeldahl; nach seinen Angaben stimmt das Mittel der Bestimmungen nach diesem Verfahren sehr gut zu dem Mittel der Bestimmungen nach Ludwig, in den zusammengehörigen Analysen weichen aber die Resultate beträchtlich voneinander ab. Mit reiner Harnsäure erhält man nach Geelmuyden<sup>3)</sup> durch Fällen mit Chlorbarium zwar gute Resultate, der Niederschlag aber, welcher mit Chlorbarium aus neutralisiertem unverdünnten Harn ausfällt, enthält mehr Stickstoff, als die nach Ludwig aus dem gleichen Volumen Harn gewonnene Harnsäure.

#### 5. Als Zinksalz nach Bellocq<sup>4)</sup>.

250 ccm Harn werden mit Natronlauge im Überschuss versetzt, dekantiert, mit Asbestpulver geschüttelt und filtriert. 200 ccm Filtrat werden dann mit 20 ccm einer durch Natronlauge und Soda alkalischen 30%igen Zinksulfatlösung behandelt. Der die Harnsäure als Zinkurat enthaltende Niederschlag wird nach dem Waschen durch Salzsäure zerlegt und die auskristallisierte Harnsäure gewaschen und gewogen.

#### 5. Durch Titrieren mit Silberlösung.

Bartley<sup>5)</sup> hat folgendes Verfahren vorgeschlagen, über dessen Genauigkeit noch keine weiteren Erfahrungen vorliegen. Es gründet sich, wie das Verfahren von Ludwig und von Haycraft, auf die Fällung der Harnsäure durch ammoniakalische Silberlösung; um aber die gleichzeitige Abscheidung der Xanthinbasen zu vermeiden, wird die Fällung in der Wärme vorgenommen. Es dient dazu eine  $\frac{1}{50}$  n-Silberlösung, aus deren Verbrauch die Menge der Harnsäure berechnet wird.

Zu 50 oder 100 ccm klarem Harn werden 5 ccm Magnesiamischung und etwa 11 ccm 10 proz. Ammoniak (von 0,960 Dichte), jedenfalls aber in merklichem Überschuss zugesetzt. Die Mischung wird auf dem Wasserbad erwärmt und so lange mit Silberlösung versetzt, bis ein herausgenommener Tropfen auf einer weissen Unterlage mit Schwefelalkali einen schwarzen Niederschlag gibt. Damit in dem Probetropfen nicht Silberniederschlag enthalten sei, wird die Probe mit einer Pipette entnommen, an deren Ende behufs der Filtration ein Bäschchen Watte befestigt ist. Wie besondere Versuche ergaben, tritt die Endreaktion erst dann ein, wenn 1% der Harnmenge an Silberlösung mehr zugesetzt ist, als die Harnsäure zur Fällung erfordert. Der ccm der  $\frac{1}{50}$  n-Silberlösung zeigt 3,36 mg Harnsäure an.

<sup>1)</sup> Berliner klin. Wochenschr. 1911. Nr. 48.

<sup>2)</sup> Deutsche med. Wochenschr. 37. 1112. 1911.

<sup>3)</sup> Byasson, Journ. de pharm. et de chimie 6. 20. 1882. — E. D. Baftalowskij, Wratsch 1888; Jahresber. f. Tierchemie 18\*8. 128. — H. Chr. Geelmuyden, Zeitschr. f. analyt. Ch. 31. 166. 1892.

<sup>4)</sup> Journ. Pharm. Ch. 12. 103/4. 1900; Ch. Zeitschr. 1900. III.

<sup>5)</sup> E. H. Bartley, Journ. of the Amer. chem. Soc. 19. 649; Chem. Zentralblatt 1897. 2. 644.

## 7. Durch Reduktion von Jodsäure.

a) Nach Ruhemann<sup>1)</sup>.

Nach Kalatschnikoff<sup>2)</sup> und nach J. Tzuschlewitsch<sup>3)</sup> ist das Verfahren von Ruhemann unbrauchbar.

b) Nach Merck<sup>4)</sup>.

Ein abgemessenes Harnvolumen wird mit Weinsäure oder Zitronensäure und dann mit Jodsäure versetzt. Das in Freiheit gesetzte Jod wird mit Chloroform ausgeschüttelt, das Chloroform mit 50% Alkohol verdünnt und mit Thio-sulfatlösung die Menge des abgeschiedenen Jods titriert.

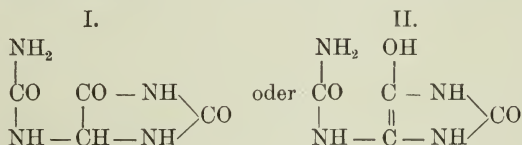
## 8. Durch Reduktion von Silbersalz.

Roethlisberger<sup>5)</sup>.9. Bestimmung der Harnsäure im Vogelharn nach Kossa<sup>6)</sup>.

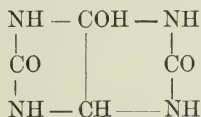
Der Vogelharn wird 1—3 Tage mit schwefelsäurehaltigem 90%igem Alkohol stehen gelassen. Der Rückstand wird abfiltriert und mit warmem 90%igem Alkohol gewaschen. Hierauf wird der Niederschlag getrocknet in 10—20 cem konzentrierter Schwefelsäure gelöst und die braune Lösung mit 200—400 cem Alkohol gefällt. Die Harnsäure scheidet sich vollständig aus, wird mit Alkohol gewaschen und gewogen.

## D. Das Allantoin.

$C_4H_6N_4O_3$ . Mol.-Gew. 158. C = 30,33%; H = 3,83%; N = 35,44%.



Mendel und Dakin<sup>7)</sup> halten wegen der optischen Inaktivität des Allantoins die zweite Formel für den richtigeren Ausdruck. H. Biltz<sup>8)</sup> diskutiert eine dritte Möglichkeit



Dagegen wenden H. J. Fenton und W. A. Wilks<sup>9)</sup> ein, dass das Allantoin eine Farbenreaktion gebe, welche für Ureide mit der Gruppe  $\text{NH}_2 - \text{CO} - \text{NH} -$  charakteristisch sei. Eine Probe der zu untersuchenden Substanz mit einem Tropfen rauchender Salzsäure versetzt, erzeugt auf Methylfurfurpapier einen blauen Fleck.

<sup>1)</sup> Berliner klin. Wochenschr. 1902. 27. 55. 1905. 1252. (J. T. 36. 308.)

<sup>2)</sup> Russki Wratsch 1902.

<sup>3)</sup> Diss. Petersburg 1906. J. T. 36. 308.

<sup>4)</sup> Pharm. Zeitschr. 50. 791. 1905.

<sup>5)</sup> Münch. med. Wochenschr. 1910. Nr. 7.

<sup>6)</sup> Zeitschr. f. ph. Ch. 47. 1. 1906.

<sup>7)</sup> Journ. of biol. Ch. 7. 153. 1909/10.

<sup>8)</sup> B. B. 43. 1999. 1910.

<sup>9)</sup> Proc. Cambridg philos. soc. 16. 64. 1911.



Vorkommen und physiologisches Verhalten. Das Allantoin wurde von Vauquelin und Buniva im Jahre 1749 in der Amnionflüssigkeit der Kühe entdeckt (Acide amniotique). Lassaigue fand den Stoff in der Allantoisflüssigkeit der Kühe und nannte ihn Acide allantique<sup>1)</sup>. Liebig und Wöhler gaben den jetzt gebräuchlichen Namen Allantoin<sup>2)</sup>. Liebig fand es im Harn saugender Kälber<sup>3)</sup>. Es findet sich im Harn aller Säugetiere in reichlicher Menge bei jeder Ernährung und im Hunger<sup>4)</sup>. Mittlere Hunde scheiden in 24 Stunden 0,20—0,30, Kaninchen 0,07 bis 0,15 ccm aus. Der Menschenharn enthält nur wenig Allantoin. In 24 Stunden werden bloss 5—15 mg ausgeschieden. Im Harn des Säuglings fand Schittenhelm<sup>5)</sup> 1—2 mg auf den Liter. Die Angabe, dass das Allantoin im Harn von Schwangeren besonders reichlich vorkomme<sup>6)</sup>, beruht auf einem Irrtum<sup>7)</sup>. In dem Inhalt einer atresischen Blase eines Fötus fand Panzer nennenswerte Mengen von Allantoin<sup>8)</sup>. Im menschlichen Fruchtwasser habe ich es vermisst<sup>9)</sup>. Auch im Harn der Selachier scheint es zugegen zu sein (unveröffentlicht), ob es in dem der Amphibien einen normalen Bestandteil ausmacht, ist noch nicht sicher. Das Allantoin ist auch im Pflanzenreiche weit verbreitet. Schulze und Barbieri<sup>10)</sup> und Schulze und Bosshardt<sup>11)</sup> fanden es in den Trieben von Platanen- und Acerarten. In den sogenannten Weizenembryonen, einem Abfallprodukt der Müllerei, haben es Richardson und Crampton<sup>12)</sup>, in der Rinde der Rosskastanie Schulze und Bosshardt<sup>13)</sup>, im Rübensaft Lippmann<sup>14)</sup>, in Bohnen und Linsen sowie im Brote Acroid<sup>15)</sup> nachgewiesen, in alten Kartoffeln fand ich es einmal in geringer Menge, in jungen einmal nicht. Von Wichtigkeit ist der von Acroid (l. c.) geführte Nachweis, dass die Kuhmilch viel Allantoin enthält. In den Hühnereiern hat es Acroid vermisst. (Über den Gehalt einzelner Nahrungsmittel an Allantoin vgl. die Tabelle auf Seite 917.) Zum Zwecke der Zusammenstellung einer allantoinfreien Kostordnung haben wir einige Nahrungsmittel auf Allantoin untersucht. Wir fanden es bei Verarbeitung von 2 kg Weizenmehl nicht,

<sup>1)</sup> Ann. de ch. et de Phys. **17**. 301. 1821.

<sup>2)</sup> Ann. Ch. Pharm. **26**. 245. 1838.

<sup>3)</sup> Wöhler, Ann. Ch. Pharm. **70**. 229. 1849; **88**. 100. 1853.

<sup>4)</sup> Wiechowski, Hofmeisters Beiträge z. chem. Phys. u. Path. **11**. 109. 1907.

<sup>5)</sup> Zeitschr. f. d. ges. Phys. u. Path. d. Stoffw. **5**. 644. 1910.

<sup>6)</sup> Pouchet, Contr. à la Conn. des mat. extr. de l'urine. Paris 1880.

<sup>7)</sup> A. Scheib, unveröffentlicht.

<sup>8)</sup> Zeitschr. f. Heilk. **23**. 79. 1901.

<sup>9)</sup> Arch. f. exp. Path. u. Pharm. **60**. 180. 1909.

<sup>10)</sup> Journ. f. pr. Ch., n. F. **25**. 145. 1882.

<sup>11)</sup> Zeitschr. f. ph. Ch. **9**. 420. 1885.

<sup>12)</sup> B. B. **19**. 1180. 1886.

<sup>13)</sup> l. c.

<sup>14)</sup> B. B. **29**. 2645. 1896. — Smolenski, Zentralverb. deutsch. Zuckerindustr. **1910**. 1215.

<sup>15)</sup> Bioch. Journ. **5**. 400. 1910.

ebensowenig in 2 kg junger Kartoffeln und im Spargel. Dagegen konnte aus 2 kg Sauerkraut Allantoin, allerdings in geringer Menge, erhalten werden (A. Scheib, unveröffentlicht).

Das Allantoin ist das Hauptendprodukt des Purinstoffwechsels der Säugetiere mit Ausnahme des Menschen und der anthropoiden Affen<sup>1)</sup>. Es wird von Tier und Mensch nach subkutaner Injektion unverändert und quantitativ ausgeschieden<sup>2)</sup>, von per os aufgenommenem Allantoin scheiden dagegen die Menschen nur einen geringen Bruchteil im Harn aus. Bei der weiten Verbreitung des Allantoins unter unseren Nahrungsmitteln ist die Möglichkeit gegeben, dass das Allantoin des Menschenharns rein exogener Natur ist<sup>3)</sup>. Dem scheint aber nicht so zu sein. Es wurde auch im Hunger gefunden<sup>4)</sup> und bei einer Kost, welche auf Grund unserer Untersuchungen als allantoin- und purinfrei anzusehen war<sup>5)</sup>. Die ursprünglich von mir gemachte Annahme, dass die geringen Allantoinmengen des Menschenharns einer minimalen Harnsäureoxydation ihren Ursprung verdanken, hat aber ihre Grundlage verloren, da der grösste Teil des vom Menschen auch bei sogenannten purinfreiem Regime ausgeschiedenen Allantoins sicherlich exogener Natur ist.

Alles, was oben über die Physiologie, Pathologie und Pharmakologie der Purinausscheidung der Säuger gesagt worden ist, gilt mit Ausnahme des Menschen und des anthropoiden Affen für das Allantoin. Das gilt insbesondere auch für die exogene Purinausscheidung der Säugetiere, welche quantitativ als Allantoin erfolgt (S. 924). Da das Allantoin infolge seiner leichteren Löslichkeit keine Retentionstendenz wie die Harnsäure hat, so bietet die Verfolgung der Allantoinausscheidung ein Hilfsmittel zur Entscheidung der Frage, ob ein Eingriff den Purinstoffwechsel beeinflusst oder nicht. Trotz gesteigerter Diurese änderte sich die endogene Allantoinausscheidung von Kaninchen nicht (Tagesperioden, unveröffentlicht). Die Angabe, dass die Hydrazinvergiftung zu einer besonders reichlichen Allantoinausscheidung Veranlassung gebe<sup>6)</sup>, konnte für die Katze von Mendel und Brown<sup>7)</sup> nicht bestätigt werden. Mit einer einwandfreien Bestimmungsmethode habe ich mit A. Fröhlich keinen Einfluss der Hydrazinvergiftung auf den Purinstoffwechsel von Kaninchen und Hunden feststellen können

<sup>1)</sup> W. Wiechowski, Hofmeisters Beitr. z. chem. Phys. u. Path. **9**. 295. 1907; **11**. 109. 1907. — Schittenhelm u. Seisser, Zeitschr. f. exp. Path. u. Th. **7**. 116. 1909. — Underhill u. Kleiner, Journ. biol. Ch. **4**. 165. 1908. — Abderhalden u. Einbeck, Zeitschr. f. ph. Ch. **62**. 329. 1909. — Wiechowski, Prager med. Wochenschr. **37**. Nr. 22. 1912.

<sup>2)</sup> W. Wiechowski, Arch. f. exp. Path. u. Pharm. **60**. 185. 1909. — Schittenhelm u. Seisser, l. c.

<sup>3)</sup> Schittenhelm u. Wiener, Zeitschr. f. ph. Ch. **63**. 283. 1909. Acroid. l. c.

<sup>4)</sup> Asher, Biochem. Zeitschr. **26**. 370. 1910.

<sup>5)</sup> A. Scheib, unveröffentlicht.

<sup>6)</sup> Borissow, Zeitschr. f. ph. Ch. **19**. 499. 1894. — Poduschka, Arch. f. exp. Path. u. Pharm. **48**. 1902. — J. Pohl, ebenda **48**. 367. 1902.

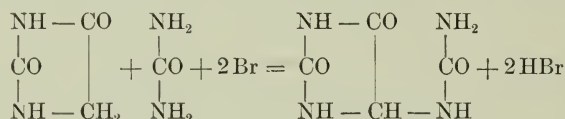
<sup>7)</sup> Am. Journ. of phys. **3**. 261. 1900.

(unveröffentlicht). Auch die Angabe, dass bei der Autolyse reichlich Allantoin entstehe, beruht auf einem Irrtum (unveröffentlicht). Die Angabe über reichliches Auftreten von Allantoin im Menschenharn nach Genuss von Tannin bedarf noch der Nachprüfung. Feith (Diss., Bonn 1900) fand nach Tannin- und Thymusgenuss keine Allantoinausscheidung beim Menschen.

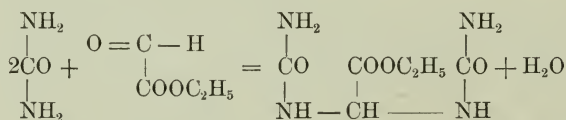
Das Allantoin entsteht im Säugetierkörper oxydativ aus der intermediär gebildeten Harnsäure oder möglicherweise auch direkt aus den Purinbasen. Eine synthetische Bildung aus purinfreien Vorstufen konnte nicht nachgewiesen werden<sup>1)</sup>. Glycolyldiharnstoff geht beim Durchleiten durch die Hundeleber und bei Fütterung an Hunde in Allantoin über<sup>2)</sup>. Die allantoinbildende Fähigkeit der Glyoxylsäure dagegen beruht vielleicht auf einer ohne Zutun des Organismus im Harn zwischen Harnstoff und Glyoxylsäure eintretenden Synthese<sup>3)</sup>.

#### Bildung.

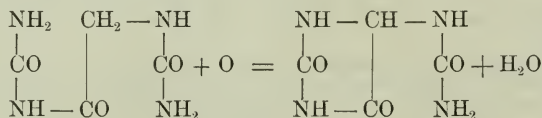
1. Aus Hydantoin und Harnstoff unter dem Einflusse von Brom (L. Siemonsen<sup>4)</sup>).



2. Aus Glyoxylsäure und Harnstoff<sup>5)</sup>. Harnstoff und Glyoxylsäureester gehen unter Einfluss von Salzsäure in Allantoinsäureester über, aus welchem Ammoniak oder Lauge Allantoin frei macht<sup>6)</sup>.



Adler<sup>7)</sup> prüfte, ob bei Zugabe von Glyoxylsäure zu Harn Allantoin entstehe. Glykolyldiharnstoff wird beim Durchleiten durch die überlebende Hundeleber und bei Fütterung an Hunde zu Allantoin oxydiert (H. Eppinger<sup>2)</sup>).



<sup>1)</sup> Nach Fütterung von Histidin. — Abderhalden, Einbeck u. Schmid, Zeitschr. f. ph. Ch. **68**. 395. 1910.

<sup>2)</sup> Eppinger, Hofmeisters Beitr. z. ch. Phys. u. Path. **6**. 287. 1905.

<sup>3)</sup> Adler, Arch. exp. Path. u. Pharm. **56**. 207. 1907.

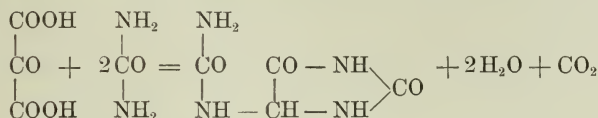
<sup>4)</sup> Ann. d. Ch. u. Pharm. **333**. 101. 1904.

<sup>5)</sup> Grimaux, Ann. de ch. et de phys. **11**. 389. 1877.

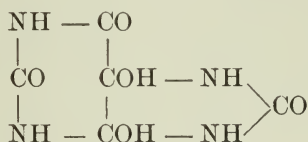
<sup>6)</sup> L. J. Simon u. G. Chavanne, C. R. ac. des sc. **143**. 51. 1906.

<sup>7)</sup> Arch. f. exp. Path. u. Pharm. **56**. 207. 1907.

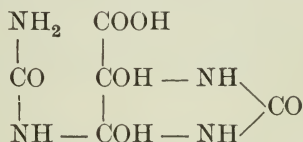
## 3. Aus Mesoxalsäure und Harnstoff



4. Ferner entsteht Allantoin bei der Oxydation der Harnsäure in alkalischer oder neutraler Lösung durch Permanganat etc. (s. S. 1026). Hierbei entsteht zunächst ein Zwischenprodukt, welches beim Eindampfen in saurer Lösung in Allantoin, beim Eindampfen in alkalischer Lösung in Uroxansäure übergeht. Dieses Zwischenprodukt ist nach Sundwik<sup>1)</sup> sowie Behrend<sup>2)</sup> Dihydroharnsäure.



Sundwik schreibt die Uroxansäure:



Aus diesem Zwischenprodukt, der Dihydroharnsäure, entsteht durch intramolekulare Umlagerung die S. 1026 bereits erwähnte Glycoluriloxycarbonsäure. Man kann sich das Zwischenprodukt auch als Glycolurilcarbonsäure denken, die durch Aufnahme von einem Molekül Wasser und Verschiebung der einen Harnstoffbindung direkt aus Harnsäure hervorgehen kann<sup>3)</sup>.

Bei der Oxydation der Harnsäure durch Ozon kann man folgendes beobachten: Leitet man in eine Suspension von Natriumurat in Wasser 7—10%igen Ozon, so bemerkt man in kurzer Zeit, dass sich die Suspension klärt und schliesslich alles Ungelöste verschwindet. Die Flüssigkeit ist jetzt ganz klar. Bricht man in diesem Zeitpunkte den Versuch ab, so findet man in der Flüssigkeit reichlich Allantoin. Setzt man das Einleiten aber fort, so entsteht nach einiger Zeit unter Zersetzung des Allantoins wieder ein weisser, krystallinischer Niederschlag und in der überstehenden Flüssigkeit ist kein oder wenig Allantoin, dagegen

<sup>1)</sup> Zeitschr. f. ph. Ch. **41**. 343.

<sup>2)</sup> Ann. d. Ch. u. Pharm. **333**. 141; s. a. b. Burian, Zeitschr. f. ph. Ch. **43**. 528. 1905.

<sup>3)</sup> W. Wiechowski, Hofmeisters Beitr. z. ch. Phys. u. Path. **9**. 295. (1907).



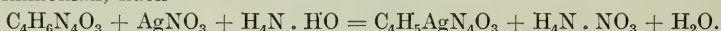
andere Stoffe, die leicht krystallisiert zu erhalten sind, enthalten (v. Knafl und Wiechowski, unveröffentlicht), deren Untersuchung noch aussteht.

Glatt erfolgt die Oxydation der Harnsäure zu Allantoin durch ein Ferment des Säugetierorganismus, die Uricooxydase<sup>1)</sup>.

Eigenschaften. 1. Das Allantoin krystallisiert rein in grossen monoklinen Prismen mit hexagonaler Grundform, die oft zu sternförmigen Drusen vereinigt sind, unrein aber auch in Warzen und Körnern. Es reagiert neutral, löst sich schwer in kaltem Wasser (bei 20° nach Liebig und Wöhler in 160, nach Schulze und Barbieri in 186 Thn.), leichter in (30 Teilen) heissem, leicht in Laugen, in Piperazinslösung nach Salkowski leichter als in Wasser. Es löst sich auch, allerdings schwer, aber deutlich, in Alkohol, Amylalkohol und Aceton. In Äther ist es unlöslich. Dieser fällt das Allantoin aus den Lösungen in Alkohol oder Aceton in prächtigen weissen Krystallen<sup>2)</sup>. Von Tierkohle wird Allantoin aus wässriger Lösung in grösstem Umfange adsorbiert, aus alkoholischer Lösung jedoch gar nicht<sup>2)</sup>.

2. Es verbindet sich mit Basen und mit Säuren zu Salzen. Von diesen Verbindungen sind namentlich die mit Silberoxyd und mit Quecksilberoxyd für den Nachweis des Allantoins wichtig. Durch die Bleiacetate, sowie durch Phosphorwolframsäure wird es nicht gefällt. Das Kalium-, Ammonium- und Bariumsalz krystallisieren. Das Kaliumsalz löst sich in 15 Teilen Wasser.

a) Allantoin-Silber,  $C_4H_5AgN_4O_3$ . Eine wässrige Allantoinlösung gibt mit salpetersaurem Silber keinen Niederschlag, wohl aber bei vorsichtigem Zusatz von Ammoniak, nach



Der weisse Niederschlag löst sich leicht in Salpetersäure und in Ammoniak und tritt bei genauer Neutralisation der Lösungen wieder auf. Er besteht aus sehr kleinen durchsichtigen strukturlosen mikroskopischen Tröpfchen und erscheint in grösseren Massen flockig. Die ammoniakalische Lösung des Niederschlags verändert sich beim Kochen nicht und gibt nachher beim Neutralisieren den ursprünglichen Niederschlag wieder. Die Lösung des Allantoin-silbers in überschüssigem Ammoniak lässt auf Zusatz von reichlichen Mengen 10 % Silbernitratlösung den Niederschlag wieder ausfallen<sup>3)</sup>. Statt mit verdünntem Ammoniak kann man auch durch Zusatz von Magnesiumoxyd das Allantoin-silber abscheiden<sup>4)</sup>. Hierbei hat man den Vorteil, dass eine Wiederauflösung des einmal Gefällten nicht eintreten kann, da sich nur so viel Magnesiumoxyd löst, als der freiwerdenden Salpetersäure entspricht.

b) Allantoin-Quecksilberoxyd. Salpetersaures Quecksilberoxyd gibt mit Allantoinlösung sofort einen flockigen weissen Niederschlag, der sich anfangs beim Umschütteln, namentlich beim Erwärmen, wieder löst. Die Lösung bleibt auf Zusatz von kohlensaurem Natron klar, scheidet aber bei vorsichtigem Zusatz von Natronlauge einen weissen Niederschlag ab, der sich in einem Überschuss der Lauge löst und sofort, namentlich schnell beim Erwärmen, metallisches Quecksilber absetzt. Fügt man zu einer Allantoinlösung sogleich reichlich salpetersaures Quecksilberoxyd, so entsteht ein dauernder, im Überschuss des Reagens

<sup>1)</sup> Wiechowski, Hofmeisters Beitr. z. ch. Phys. u. Path. **9**. 295. 1907.

<sup>2)</sup> Wiechowski, unveröffentlicht.

<sup>3)</sup> Poduschka, Arch. f. exp. Path. u. Pharm. **44**. 59.

<sup>4)</sup> Löwi, ebenda **44**. 1. 1900.

nicht sichtlich, aber in Salpetersäure löslicher Niederschlag. Die Quecksilberfällung des Allantoins wird wie die Analoge des Harnstoffs durch Anwesenheit von Cl-Ionen gehemmt bis verhindert, auch Ammonsalze und hohe Harnstoffkonzentrationen hemmen<sup>1)</sup>. Durch freies Alkali wird diese Hemmung aufgehoben. Das Allantoin fällt auch wie der Harnstoff mit dem Reagens von Freund und Fellner (S. 544) noch in grösster Verdünnung.

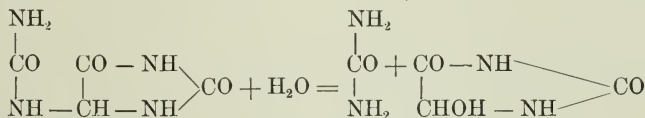
Eine 0,5%ige Lösung von Quecksilberacetat in 20%igem Natriumacetat fällt Allantoin praktisch quantitativ<sup>1)</sup>, ohne den Harnstoff zu fällen. Die Lösung darf keine Chloride und Ammonsalze und nicht mehr als 1% Harnstoff enthalten und soll neutral oder von Magnesia eben alkalisch sein. Bei saurer Reaktion fällt das Allantoin nicht, bei von Laugen oder Alkalicarbonaten alkalischer Reaktion kann auch Harnstoff mit gefällt werden. Hat man die Lösung aber vorher mit Magnesia behandelt und filtriert, so reagiert sie zwar alkalisch, aber Harnstoff fällt hierbei nicht aus<sup>2)</sup>. Der Niederschlag enthält auf 1 Mol. Allantoin 1,5 Atome = 3 Äquivalente Quecksilber<sup>2)</sup>, er lässt sich mit Wasser gut waschen, worin er allerdings spurweise löslich ist bzw. Quecksilber verliert, und nach dem Lösen in Salpetersäure lässt sich sein Quecksilbergehalt bequem durch Titration mit Rhodansalz ermitteln.

Quecksilberchlorid gibt mit Allantoin keinen Niederschlag, ebenso nicht auf nachträglichen Zusatz von kohlensaurem Natron, wohl aber bei Zusatz von Natriumhydrat einen im Reagens löslichen Niederschlag, dessen alkalische Lösung gleichfalls unter Abscheidung von metallischem Quecksilber trüb und grau wird.

Allantoin löst Quecksilberoxyd beim Kochen auf, beim Erkalten erhält man eine Verbindung von 6 Allant. + 5 HgO. Diese zersetzt sich mit Wasser zu 3 Allant. + 2 HgO. Der Niederschlag durch Quecksilbernitrat soll die Zusammensetzung 4 Allant. + 5 HgO haben.

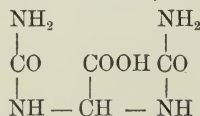
### 3. Zersetzungen.

a) Beim Erhitzen mit Salzsäure und anderen Säuren zerfällt das Allantoin in Allantursäure und Harnstoff.



Die Allantursäure ist identisch mit Glyoxalylharnstoff<sup>3)</sup>. Man erhält sie durch Behandeln von Allantoin mit Salpetersäure oder Bleisuperoxyd und Wasser auch durch Erhitzen von Allantoin mit Wasser auf 140°<sup>4)</sup>.

b) Eine frisch bereitete Lösung von Allantoin in Natron- oder Kalilauge gibt beim Übersättigen mit Säure (Essigsäure) sofort einen Niederschlag von Allantoin, nach mehrtägigem Stehen aber nicht mehr; sie enthält dann Allantoinsäure,



<sup>1)</sup> W. Wiechowski, Hofmeisters Beitr. z. chem. Phys. u. Path. 11. 109. 1907.

<sup>2)</sup> Unveröffentlicht.

<sup>3)</sup> Medicus, B. B. 10. 545. 1875.

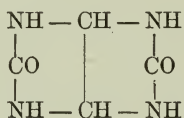
<sup>4)</sup> Pelouze, Ann. Ch. Pharm. 44. 107. 1842.

Beim Kochen mit Alkalien oder Barytwasser liefert Allantoin, wie bei der Zersetzung mit Säuren, gleichfalls zunächst Allantursäure und Harnstoff, die Allantursäure zerfällt aber weiterhin in Hydantoin-säure und Parabansäure und die Parabansäure in Oxalsäure und Harnstoff.

Würde die Hydantoin-säure weiter zu Glycin, Kohlensäure und Ammoniak zersetzt, so würden 2 Mol. Allantoin 2 Mol.  $\text{CO}_2$  und 3 Mol.  $\text{NH}_3$  geben, und bei der Zerlegung auch des Glykokolls würde noch 1 Mol.  $\text{CO}_2$  hinzukommen. Diese vollständige Zersetzung erleidet nach Schöndorff das Allantoin beim Erhitzen mit alkalischer Chlorbariumlösung auf  $230^\circ$ ; bei  $150^\circ$  entstehen (aus 2 Mol. Allantoin) 2 Mol.  $\text{CO}_2$ .

c) In Lösung <sup>1)</sup> und im Harn <sup>2)</sup> zersetzt sich das Allantoin spontan in längerer oder kürzerer Zeit auch bei Abwesenheit von Bakterien. Beim Kochen mit Wasser ist schon nach einer Stunde Zersetzung nachweisbar <sup>1)</sup>. Die spontane Zersetzung wird bei alkalischer Reaktion (im Harn) besonders rasch eintreten.

d) Reduktion von Allantoin durch Jodwasserstoffsäure liefert Glycoluril oder Harnstoff und Hydantoin.



4. Allantoin reduziert bei anhaltendem Kochen Fehlingsche Lösung unter Abscheidung von Kupferoxydul.

5. Wie der Harnstoff gibt das Allantoin die Schiff'sche Furfuroreaktion (S. 574), aber etwas weniger schnell und nicht so intensiv wie dieser (Schiff<sup>3)</sup>).

6. Es gibt die Murexidprobe (S. 1029) nicht.

7. Nach Malerbe <sup>4)</sup> entwickelt das Allantoin bei der Einwirkung von Hypobromit die Hälfte seines Stickstoffs gasförmig.

8. Allantoin gibt nach vorläufiger Behandlung mit Salzsäure bei der Einwirkung von salpetriger Säure 68,6—99,5 % seines Stickstoffs als Gas ab, allen Stickstoff erst nach sehr langer Einwirkung der Salzsäure (Kreusler<sup>5)</sup>).

9. Es gibt in typischer Weise die für Glyoxylsäure charakteristische Reaktion, wenn man in seinen Lösungen wenig Pepton oder Tryptophan auflöst und dann mit konzentrierter Schwefelsäure unterschichtet. Es entsteht an der Schichtgrenze ein schön blauer Ring und beim Umschütteln färbt sich die ganze Flüssigkeit blauviolett <sup>1)</sup>. In manchen Fällen lässt sich die Reaktion wie die der Glyoxylsäure durch Zugabe von einem Tropfen verdünnter Eisenchloridlösung verstärken <sup>6)</sup>.

Darstellung. a) Aus Kälberharn. Derselbe wird im Wasserbad zum Sirup verdunstet und mehrere Tage in der Kälte stehen gelassen,

<sup>1)</sup> Wiechowski, Bioch. Zeitschr. **25**. 453. 1910.

<sup>2)</sup> Salkowski, Zeitschr. f. ph. Ch. **42**. 213. 1904.

<sup>3)</sup> H. Schiff, Berichte d. chem. Gesellsch. **10**. 774. 1877.

<sup>4)</sup> P. Malerbe, Berichte d. chem. Gesellsch. **19**. Ref. 252.

<sup>5)</sup> U. Kreusler, Landwirtsch. Versuchsstationen **31**. 309. 1885.

<sup>6)</sup> O. Adler (unveröffentlicht).



wobei Allantoin und phosphorsaure Magnesia auskrystallisieren und sich gelatinöse harnsaure Magnesia ausscheidet. Man trennt durch Schlämmen die Krystalle von der Gallert, kocht sie mit Wasser unter Zusatz von etwas Tierkohle, wobei der grösste Teil des Phosphats ungelöst bleibt, filtriert heiss, macht das Filtrat mit Salzsäure schwach sauer, wodurch das in Lösung gegangene Phosphat in Lösung erhalten wird, und lässt krystallisieren (Wöhler).

b) In bester Ausbeute erhält man das Allantoin aus Harnsäure nach dem S. 1026 beschriebenen Verfahren.

Nachweis. Bei den nur vieldeutigen Reaktionen des Allantoins kann sein Nachweis nur dann als erbracht gelten, wenn man es als solches krystallisiert abgeschieden und durch Bestimmung des Schmelzpunktes, der sich nach Mischung mit reinem Allantoin nicht ändern darf (234°), bzw. Feststellung, dass ein Zusatz des fraglichen Produkts den Schmelzpunkt von reinem Allantoin nicht verändert, identifiziert hat. Alle Reaktionen, die man mit dem isolierten Produkt anstellt, haben nur unterstützenden Wert. Hat man genügend Material, so kann man auch eine N-Bestimmung nach Kjeldahl oder Dumas ausführen. Reines Allantoin hat einen N-Gehalt von 35,44%.

1. Das Allantoin ist zunächst aus dem Harn zu isolieren.

a) Wenn man Harn oder einen alkoholischen Auszug desselben verdunstet hat, so kann das Allantoin auskrystallisieren und dann beim Lösen des Rückstands in Wasser als schwer löslicher Körper zurückbleiben. Natürlich gewährt dieses Verfahren keine Sicherheit und wäre zum Aufsuchen des Allantoins nicht zu empfehlen.

b) Sicherer ist folgende von G. Meissner<sup>1)</sup> angegebene Methode.

Man fällt Harn mit Barytwasser aus, neutralisiert das Filtrat genau mit Schwefelsäure, filtriert nochmals und dampft bis zur beginnenden Krystallisation ein. Die noch warme Flüssigkeit wird mit so viel Alkohol vermischt, dass ein sich gut abscheidender Niederschlag entsteht, die alkoholische Lösung abgossen oder abfiltriert, und mit Äther vollständig ausgefällt. Beide Niederschläge, namentlich der mit Äther erhaltene, können das Allantoin in allerdings noch nicht charakteristischen Krystallen neben anderen Substanzen enthalten. Die Niederschläge werden mit wenig kaltem Wasser oder mit heissem Weingeist extrahiert, wobei das Allantoin zurückbleibt. Beim Umkrystallisieren des Rückstands aus heissem Wasser erhält man es alsdann sofort in den schönsten Krystallen ganz rein.

c) Ein anderes, gleichfalls von G. Meissner<sup>2)</sup> herrührendes Verfahren ist folgendes:

Der Harn wird mit Bariumhydrat, der gelöste Baryt mit Schwefelsäure genau ausgefällt und das alkalische Filtrat nun so lange mit Quecksilberchlorid versetzt, als noch ein Niederschlag entsteht. Derselbe wird sofort abfiltriert und die saure, viel überschüssiges Quecksilber enthaltende Flüssigkeit mit Kali- oder Natronlauge genau neutral gemacht, wobei aufs neue ein Niederschlag auftritt. Man setzt dann abwechselnd Sublimat und Alkalihydrat hinzu, bis bei neutraler Reaktion kein Niederschlag mehr entsteht (wobei man darauf zu achten hat, dass die Flüssigkeit nicht alkalisch wird: S. 1053. Beide Niederschläge können Allantoin (neben Harnsäure) enthalten. Sie werden gewaschen, in Wasser suspendiert,

<sup>1)</sup> G. Meissner, Zeitschr. f. rat. Med. [3]. 24. 104 u. 31. 297.

<sup>2)</sup> G. Meissner, Zeitschr. f. rat. Med. [3]. 31. 304.



mit Schwefelwasserstoff zerlegt, die Flüssigkeit heiss filtriert und zur Krystallisation verdampft.

d) Frerichs und Staedeler fällten den Harn mit basisch essigsaurem Blei und dampften das entbleite Filtrat stark ein, worauf das Allantoin in Körnern auskrystallisierte.

e) Pouchet fand es in der bei der Darstellung der Xanthinbasen bleibenden kupferhaltigen Mutterlauge neben dem Carnin.

f) Am zweckmässigsten wird es sein, sich der unten beschriebenen quantitativen Abscheidung des Allantoins zu bedienen (S. 1076).

2. Von einigen der erhaltenen, nötigenfalls nochmals umkrystallisierten Krystalle bereitet man sich in der Wärme in 10—15 ccm eine Lösung und prüft wie folgt:

a) Die Lösung darf weder mit Phosphorwolframsäure nach dem Ansäuern mit Mineralsäure, noch mit basischem Bleiacetat, noch mit Silbernitrat reagieren.

b) Ein Teil der Lösung wird mit salpetersaurem Silber versetzt, wobei sie klar bleibt, und dann sehr vorsichtig mit Ammoniak. Bei Gegenwart von Allantoin entsteht ein weisser, glitzernder oder flockiger Niederschlag, der aus kleinen mikroskopischen Tröpfchen besteht (S. 1052).

Man verfährt am besten so, dass man ein Tröpfchen Ammoniak an der Wand des Reagenzglases herablaufen lässt; bei der auf diese Weise bewirkten allmählichen Mischung entsteht ein wolkiger Niederschlag, der anfangs beim Schütteln wieder verschwindet, aber bei weiterem Zusatz von Ammoniak an Massigkeit zunimmt. Überschreitet man das erforderliche Mass von Ammoniak, so geht der Niederschlag wieder in Lösung, tritt aber wieder auf, wenn man nun ebenso vorsichtig salpetersaures Silber zusetzt. Das Verfahren ist also ganz dasselbe wie beim Nachweis der arsenigen Säure durch salpetersaures Silber. Beim Neutralisieren des Ammoniaks mit salpetersaurem Silber mengt sich dem Niederschlag aber Silberoxyd bei und er erscheint grau.

c) Ein anderer Teil der Lösung wird tropfenweise mit salpetersaurem Quecksilberoxyd versetzt. Der anfangs entstehende weisse flockige Niederschlag verschwindet beim Umschütteln wieder, wenn er nicht schon zu gross ist, und wird auf Zusatz von mehr Reagensdauernd. Ein paar Tropfen Natronlauge lösen den voluminösen Niederschlag sofort, die Lösung trübt sich aber alsbald und wird grau.

d) Ein dritter Teil der Lösung wird mit etwas frisch bereiteter verdünnter Fehlingscher Lösung schwach blau gemacht und anhaltend gekocht. Bei Anwesenheit von Allantoin scheidet sich, manchmal erst beim Stehen der Flüssigkeit, rotes Kupferoxydul ab.

e) Einem vierten Teil setzt man ein Stäubchen Wittenberg'schen Peptons zu und unterschichtet nach der Lösung mit konzentrierter Schwefelsäure. Nach kurzem Warten, während man das Röhrchen leicht schwenkt, ohne jedoch zu mischen, entsteht an der Berührungsstelle beider Flüssigkeiten ein violetter Ring. Mischt man nun durch kräftigeres Schwenken, so färbt sich die ganze Flüssigkeit violett. Hat man zuviel Pepton zugesetzt, so nimmt die Färbung bei Anwesenheit von nur wenig Allantoin einen bräunlichen Stich an. Ist die Reaktion nicht sehr

deutlich, so kann man vor dem Mischen einen Tropfen einer verdünnten Eisenchloridlösung zusetzen, mitunter wird dann die Reaktion prachtvoll dunkelviolett.

f) Einige Kryställchen werden mit ziemlich konzentrierter Natron- oder Kalilauge gekocht, bis der entweichende Dampf befeuchtetes rotes Lackmuspapier stark bläut; dann wird die Flüssigkeit mit Essigsäure mässig übersättigt und mit einigen Tropfen Chlorcalciumlösung versetzt. Ein sofort eintretender feinpulveriger, in Essigsäure unlöslicher, in Salzsäure löslicher Niederschlag (von Calciumoxalat) weist auf die Gegenwart von Allantoin hin (S. 1054).

g) Man stellt mit einigen Kryställchen die Schiffsche Furfurolreaktion an.

h) Das Ausbleiben der Murexidreaktion schützt vor einer Verwechslung mit Harnsäure.

i) Zur weiteren Sicherung des Befundes kann man von einer grösseren Menge der Silberverbindung eine Silberbestimmung ausführen. Der Niederschlag wird mit Wasser silberfrei gewaschen, im Vakuum über Schwefelsäure getrocknet und geglüht; die reine Verbindung hinterlässt dabei nach der Rechnung 40,75% Silber.

Man kann auch den Hg-Gehalt des mit dem S. 1053 angeführten Reagens gewonnenen Niederschlags ermitteln, welcher 3 Äquivalente Hg auf 1 Mol. Allantoin ausmacht. Sowohl Silber- als Quecksilbergehalt lassen sich bequem in der salpetersauren Lösung der betreffenden Niederschläge durch Titration mit  $n/10$ -Rhodanlösung ermitteln. 1 ccm der  $n/10$ -Rhodanlösung entspricht bei der Silberverbindung 15,8 mg, bei der Quecksilberverbindung 5,27 mg Allantoin.

## Quantitative Bestimmung.

### 1. Mittelst des Silbersalzes.

Poduschka<sup>1)</sup> einerseits und Loewi<sup>2)</sup> andererseits haben das Allantoin im Harn durch Silberfällung niedergeschlagen. Poduschka fällte den Harn zunächst mit basischem Bleiacetat aus und das überschüssige Blei mit Natriumsulfatlösung. In dem Filtrat von diesem wurde das Chlor durch 10% Silbernitratlösung und in dem Filtrat vom Chlorsilber das Allantoin durch vorsichtigen Zusatz von verdünntem Ammoniak gefällt. Es wurde solange verdünntes Ammoniak zugesetzt, als der Niederschlag noch zunahm bzw. sich eben zu lösen begann, hierauf wurde ein grosser Überschuss an 10% Silbernitratlösung hinzugefügt, wodurch das etwa in Lösung gegangene Allantoin Silber wieder ausgefällt wurde. Der Silberniederschlag wurde mit verdünnter Natriumsulfatlösung ammoniakfrei gewaschen und der N-Bestimmung nach Kjeldahl unterworfen. Aus dem N-Gehalte wurde das Allantoin berechnet. 1 ccm  $n/10$  HCl = 0,00395 Allantoin.

Loewi fällt den Harn mit einer Lösung von Merkurinitrat aus, entquecksilbert das Filtrat durch Schwefelwasserstoff und trägt in dasselbe Silbernitrat und einen Überschuss von Magnesiumoxyd ein. Das gefällte Allantoin Silber wird gewaschen und mit dem beigemengten Magnesiumoxyd durch Schwefelwasserstoff zerlegt. Hierauf wird zur Trockene verdampft, mit Wasser ausgezogen und filtriert. In der nun von Harnstoff freien Lösung wird das Allantoin durch Merkuri-

<sup>1)</sup> Poduschka, l. c.

<sup>2)</sup> l. c.

nitratlösung niedergeschlagen, der Niederschlag gewaschen und der N-Bestimmung nach Kjeldahl unterworfen.

Die beiden Methoden haben keine befriedigenden Resultate geliefert, einerseits weil im Harn die Silberfällung unüberschbaren Hemmungen unterliegt, also dadurch nicht alles Allantoin niedergeschlagen wird, andererseits weil neben dem Allantoin auch andere Harnbestandteile bei diesem Vorgehen mit in den Silberniederschlag eingehen<sup>1)</sup>. Die beiden Methoden sind daher nur kurz und nicht ausführlich wiedergegeben.

## 2. Nach Wiechowski<sup>2)</sup>.

**Prinzip.** Der Harn wird mit Phosphorwolframsäure und basischem Bleiacetat völlig ausgefällt und bei Vorhandensein von Chlorwasserstoffsäure auch diese entfernt. In der von den Schwermetallen befreiten Flüssigkeit wird das Allantoin bei neutraler Reaktion durch eine 0,5%ige Quecksilberacetatlösung in 20%iger Natriumacetatlösung gefällt. Der Harnstoff bleibt hierbei quantitativ im Filtrat. Aus dem gewaschenen Niederschlag wird das Allantoin durch Schwefelwasserstoff frei gemacht und nach dem Eindampfen krystallisiert erhalten. Die Messung kann durch Wägung der Krystalle oder durch N- bzw. Hg-Bestimmung in dem Niederschlage erfolgen. Aus Tierharn wird hierbei das Allantoin rein erhalten.

Im Menschenharn, welcher sehr arm an Allantoin ist, überwiegen aber die mitgefällten Verunreinigungen, so dass noch eine Reinigung des ersten Niederschlags nötig ist. Notwendig ist es auch, das Allantoin aus Menschenharn zunächst durch eine vorläufige Fällung in einer Flüssigkeit von kleinerem Volumen anzureichern, ehe man die Fällung mit dem Allantoinreagens vornimmt.

### Erfordernisse.

1. Phosphorwolframsäure krystallisiert von Merck.
2. Gewöhnliches Bleioxyd.
3. Eine Auflösung von 5 g Quecksilberacetat und 200 g Natriumacetat in 1000 Wasser. Man kann die Lösung auf der Wage herstellen, in dem man in einem Becherglase die festen Substanzen abwägt und dann Wasser bis zu 1 kg zusetzt. Nach der völligen Lösung wird die Flüssigkeit filtriert.

### Ausführung.

Man bereitet 4—5 trockene Nutschen und Absaugkolben vor. Der auf ca. 1% Harnstoff verdünnte Harn (vom Menschenharn nehme man möglichst viel, die Verdünnung erfolgt später [s. bei b]) wird mit 1% Schwefelsäure und je nach der Harnmenge mit 5—20 ccm Essigsäure versetzt und in Proben à 2 ccm mit 50%iger Phosphorwolframsäure die gerade zur Ausfällung nötige Menge PWS ausgetastet. Aus dem Ergebnis dieser Prüfung berechnet man diejenige Menge fester PWS, welche man zu dem in Arbeit zu nehmenden Harnquantum zuzusetzen hat, um völlige Ausfällung zu erzielen. Nach dem völligen Auflösen der PWS, das man

<sup>1)</sup> Dakin, Journ. of biol. Ch. **3**. 51. 1907.

<sup>2)</sup> Die Methode ist in Hofmeisters Beiträge z. Ch. Phys. u. Path. **11**. 109. 1907 beschrieben worden. Hier teile ich zum ersten Male eine Reihe von Verbesserungen technischer Natur mit, wodurch die Methode in scheinbar geänderter Form erscheint (vgl. auch Wiechowski, Bioch. Zeitschr. **25**. 431. 1910.



durch Rühren oder Schütteln befördert, lässt man zweckmässig mehrere Stunden stehen. Nun wird abgenutscht. Hierbei erweist sich die Anwendung eines Kieselgurfilters als sehr zweckmässig, da der PWS-Niederschlag die Neigung hat, durchs Filter zu gehen. Das Kieselgurfilter stellt man am besten so her, dass man etwas von der klar abgesetzten Flüssigkeit mit einer nicht zu grossen Menge Kieselgur (Kahlbaum) in der Reibschale verrührt, den dünnen Brei auf die Nutsche giesst und scharf absaugt. Auf dem so hergestellten Filter wird nun die ganze Menge vor der Pumpe klar filtriert. Das Filtrat wird im Absaugkolben mit so viel ordinärem Bleioxyd unter Rühren versetzt, bis die Flüssigkeit alkalisch reagiert. Hierbei geht folgendes vor sich: Das Bleioxyd löst sich in der Essigsäure und das gebildete Bleiacetat reagiert unter fortwährender Neubildung solange mit der PWS und Schwefelsäure, bis diese beiden Säuren vollständig niedergeschlagen sind; hierauf löst sich noch ein gewisser Betrag von Bleioxyd in der zurückbleibenden Bleizuckerlösung und die Flüssigkeit nimmt infolge der Bildung von basischem Bleiacetat alkalische Reaktion an. Insoweit das gebildete basische Bleiacetat durch Verbindung mit noch vorhandenen Harnbestandteilen verbraucht wird, wird es immer durch neuerliches Auflösen von dem im Überschusse vorhandenen Bleioxyd zuerst in der freigewordenen Essigsäure und dann in dem gebildeten Bleiacetat wieder regeneriert.

Vom abgenutzten Filtrat wird eine kleine Probe abgegossen und mit etwas Bleiessig versetzt; es darf keine Trübung entstehen. Die gleiche Probe wird nach dem Ansäuern mit Salpetersäure mit Silbernitrat auf Chlor geprüft. Ist solches in grösserer Menge, wie im Menschenharn stets, vorhanden, als dass nur eine unbedeutende Trübung entsteht, so muss es entfernt werden, denn es verhindert die spätere Allantoinfällung. Zu diesem Zwecke giesst man das ganze Filtrat in einen Messzylinder, liest das Volumen ab, säuert mit Essigsäure deutlich an und versetzt mit Silberacetatlösung bis zur völligen Ausfällung. Nun wird das Volumen wieder notiert und vom Niederschlag zweckmässig auf Kieselgur abgenutscht. In das Filtrat wird Schwefelwasserstoff eingeleitet, bis die Schwermetalle niedergeschlagen sind. Nutsche und Durchleiten von Luft durch das Filtrat, bis ein über die Flüssigkeit gehaltenes, mit Bleiacetat befeuchtetes Papier nicht mehr geschwärzt wird. Nun wird mit Magnesiumoxyd versetzt, bis die Flüssigkeit gegen Lackmus alkalisch reagiert und ein letztesmal abgenutscht. Von hier ab verfährt man im Menschenharn anders als im Tierharn.

a) Im Tierharn. Im Filtrat wird, wie vorher mit PWS, so jetzt mit dem Allantoinreagens (1% Quecksilberacetat und 20% Natriumacetat) die gerade zur völligen Fällung des Allantoins nötige Menge Reagens ausgetastet, wobei man soviel zuzusetzen hat, bis das Filtrat der Probe einerseits auf weiterem Reagenszusatz klar bleibt, andererseits auf Zusatz von einem Tropfen einer frisch bereiteten Allantoinlösung (verdünnt) sofort einen weissen, flockigen Niederschlag ausfallen



lässt. Die letztere Probe ist stets anzustellen, auch als Prüfung auf Abwesenheit von die Hg-Fällung hemmenden Stoffen. Nun misst man von dem Filtrat eine möglichst grosse Menge genau ab und fällt sie mit der berechneten Menge Reagens. Das abgemessene Flüssigkeitsquantum entspricht, sofern man nicht gezwungen war, etwa vorhandenes Chlor auszufällen, genau ebensoviel Harn, im letzteren Falle dagegen ist die entsprechende Harnmenge durch Multiplikation mit dem Quotienten: Volumen vor dem Silberzusatz durch Volumen nach dem Silberzusatz zu berechnen.

Das so als Quecksilberverbindung ausgefällte Allantoin ist rein und kann ohne erhebliche Fehler durch Stickstoffbestimmung nach Kjeldahl oder Quecksilbertitration in dem gut gewaschenen Niederschlag gemessen werden. Der Niederschlag soll solange gewaschen werden, bis das Waschwasser nicht mehr mit einer verdünnten Mercurinitratlösung auf Harnstoff reagiert. Man kann den Niederschlag samt Filter oder ohne Filter nach Kjeldahl verbrennen, bei der Destillation setzt man zweckmässig einige ccm Thiosulfatlösung zu (S. 468). — Zur Hg-Titration löst man den Niederschlag auf dem Filter in verdünnter nitritfreier Salpetersäure, fängt die Lösung in einem Kölbchen auf, wäscht das Filter gut mit Wasser aus, versetzt die Lösung mit etwas Eisenammoniakalaun und titriert das vorhandene Hg mit n/20-Rhodan-kaliumlösung, deren Titer gegen eine n/20 Silbernitratlösung vorher bestimmt wird. — 1 ccm n/10-HCl = 0,0158 Allantoin, 1 ccm n/20-Rhodan = 0,002635 Allantoin.

Will man das Allantoin aus dem Niederschlage darstellen, so verfährt man in folgender Weise: Nach dem völligen Auswaschen breitet man das Filter auf einer dickeren Lage von Filtrierpapier aus, bis die Hauptmenge des Wassers ausgezogen ist, dann legt man es ausgebreitet an die Wand eines genügend grossen, über einem Erlenmeyerkölbchen befestigten Trichters und spritzt den Niederschlag mit 96%igem Alkohol unter Mithilfe einer Federfahne quantitativ in das Kölbchen. Hier wird er durch Schütteln fein verteilt und durch Schwefelwasserstoff zersetzt.

Reines Allantoinquecksilber schwärzt sich dabei sofort, sind auch nur wenige Verunreinigungen zugegen, so wird der Niederschlag durch  $H_2S$  zunächst gelb und erst allmählich schwarz. Nach der Zersetzung wird das überschüssige  $H_2S$  weggekocht, dann eine geringe Menge Tierkohle von Merck (pro analysi) zugesetzt und noch eine Zeitlang digeriert. Allantoin wird in alkoholischer Lösung von Tierkohle nicht adsorbiert, wohl aber in wässriger Lösung sehr ausgiebig. Nun wird filtriert, zweckmässig über Kieselgur, und etwa 6 mal mit Alkohol gewaschen. Man bringt nun zur Trockene, nimmt mit heissem Wasser auf und filtriert vom Ungelösten ab. Beim Eindampfen des kalten, farblosen Filtrats krystallisiert das Allantoin sofort aus. Eventuell muss man nach dem Verdampfen mit wenig Wasser befeuchtet einige Zeit stehen lassen.

b) Im Menschenharn. Infolge der Geringfügigkeit der im Menschenharn vorkommenden Allantoinmengen bei gleichzeitiger Anwesenheit von viel Harnstoff erhält man durch Behandlung des Filtrats vom überschüssigen Magnesiumoxyd mit der Lösung 3 zunächst gar keinen Niederschlag und erst nach längerem Stehen eine schwache Trübung, die sich erst nach langer Zeit zu einem geringfügigen Niederschlag ausbildet, aus welchem Allantoin, wenn überhaupt, nur in unwägbaren Spuren darzustellen ist. Um das gesamte Allantoin zu gewinnen, ist es notwendig, es zunächst in einer Flüssigkeit von geringer Harnstoffkonzentration anzureichern, ehe man es mit Quecksilberacetat fällt. Diese Anreicherung geschieht dadurch, dass man es gleichzeitig mit einem Teil des vorhandenen Harnstoffs fällt, wobei alles Allantoin mitgefällt wird. Speziell darauf gerichtete Untersuchungen haben gezeigt, dass bei der fraktionierten Fällung des Harnstoffs das Allantoin als der leichter durch dieselben Reagentien fällbare Stoff stets vollständig in der ersten Fraktion enthalten ist und die späteren nichts mehr davon enthalten. Die Anreicherung des Allantoins geschieht am zweckmässigsten durch Mercuriacetat- oder Nitrat; man setzt von den Reagentien soviel zu, bis ein kräftiger Niederschlag entsteht und das Filtrat mit verdünnter Allantoinlösung sofort einen deutlichen Niederschlag gibt. Vorher soll man zweckmässig bis annähernd auf 1% Harnstoffkonzentration die zu fällende Flüssigkeit verdünnen. Am zweckmässigsten hat es sich mir erwiesen, die zur Erzielung einer 1—2%igen Konzentration von Mercuriacetat notwendige Menge abzuwägen, in wenig heissem Wasser zu lösen und unter Umrühren zuzusetzen. Die entstandene Fällung, die alles Allantoin enthält, wird nach mindestens 24 stündigem Stehen auf einem Filter gesammelt und ohne viel zu waschen in das Gefäss, in dem die Fällung vorgenommen worden war, zurückgespritzt, durch Schwefelwasserstoff zerlegt, in eine Schale übergeführt und zur Trockne verdampft. Das Eindampfen ist nötig, weil das Quecksilbersulfid oft kolloidal gelöst bleibt und erst beim Eintrocknen vollständig ausflockt, ist aber bei Verwendung von Mercurinitrat überflüssig und absolut zu vermeiden, weil der Mercurinitratniederschlag stets Salpetersäure enthält, welche bei der Zerlegung frei wird und in der Hitze das Allantoin zerstören würde. Man übergiesst den trockenen Sulfidniederschlag mit heissem Wasser, digeriert kurz und filtriert in eine Schale. Das Filtrat ist bräunlich gefärbt, man wäscht gründlich mit heissem Wasser aus und engt auf ein sehr kleines Volumen ein, spült in ein kleines Zentrifugierrohr, von 1 cm lichter Weite und 10 cm Länge, versetzt mit zwei Tropfen verdünnter Schwefelsäure und trägt in die nicht mehr als 5 ccm betragende Flüssigkeit feste Phosphorwolframsäure ein, bis zur vollständigen Fällung, wovon man sich durch einen Tropfen 50%iger PWS überzeugt. Der stets entstehende Niederschlag fällt um so massiger aus, je konzentrierter die Flüssigkeit ist. Nach einigem Stehen zentrifugiert man scharf und giesst die klare Flüssigkeit in einen kleinen Kolben möglichst vollständig ab. Waschen

lässt sich der Niederschlag nicht, weil er dabei teilweise in Lösung geht. Nun wird mit verdünnter Essigsäure (5—10 Tropfen) versetzt und durch Eintragen von Bleioxyd alkalisch gemacht, hierauf bringt man auf ein Filter und wäscht vollständig aus. Das Filtrat, welches sich unterdessen von ausfallendem Bleicarbonat trübt, wird durch Schwefelwasserstoff von Blei befreit, das Bleisulfid abfiltriert und ausgewaschen, Filtrat und Waschwässer durch einen Luftstrom vom überschüssigen Schwefelwasserstoff befreit und nach dem Neutralisieren mit Soda-lösung mit der Lösung 3 das Allantoin gefällt. Den Niederschlag sammelt man nach dem klaren Absetzen auf einem Filter, wäscht ihn gründlich, zerlegt ihn mit Schwefelwasserstoff, verdampft zur Trockne, nimmt mit heissem Wasser auf, filtriert, engt ein und bringt wie oben in ein kleines Zentrifugierglas, in welchem man die ca. 5 ccm betragende Flüssigkeit mit einer 3%igen Lösung von Mercurisulfat in 10%iger Schwefelsäure tropfenweise vollständig ausfällt. Die Mercurisulfatlösung darf Allantoin auch bei geringstem Zusatze zu einer konzentrierten Lösung nicht fällen. Man hat sie daraufhin zu prüfen. Tut sie es doch, so muss sie sukzessive mit 10%iger Schwefelsäure versetzt werden, bis sie Allantoin absolut nicht mehr niederschlägt. Der braune Mercurisulfatniederschlag, der ebenfalls stets entsteht, wird nach ca. 12 Stunden abzentrifugiert und die klare weniggefärbte Lösung scharf abgegossen. Man befreit sie nach geringer Verdünnung mit Wasser durch Schwefelwasserstoff vom Quecksilber, filtriert, wäscht, bläst den überschüssigen Schwefelwasserstoff aus, neutralisiert mit Soda und fällt nun das Allantoin zum letzten Male mit Lösung 3. Mit diesem Niederschlag verfährt man nun genau so wie mit dem aus Tierharn erhaltenen, um das Allantoin krystallisiert zu erhalten. Die Krystallisation erfolgt stets nach einigem Stehen, die Mutterlauge ist nur wenig gefärbt. Man ist immer genötigt, auf ein sehr kleines Volumen, 0,5 ccm und weniger, einzuengen und soll daher entsprechend kleine, am besten geradwandige Krystallisierschälchen benützen. Zur Isolierung der Krystalle bringt man auf ein kleinstes gehärtetes Filter, saugt ab und wäscht mit Alkohol. Nach dem Trocknen bringt man die Krystalle mit einer Federfahne auf ein gewogenes Schälchen und wägt sie. Es folgt dann die Umrechnung des Resultats auf das Ausgangs-Volumen des Harns (s. o.). Das Ergebnis ist naturgemäss nicht quantitativ, da in der Mutterlauge noch Allantoin enthalten ist und man bei der zweiten Fällung mit PWS und der Fällung mit Mercurisulfat Verluste hat (diese lassen sich jedoch bei Verwendung von graduierten Zentrifugierrohren bestimmen). Ausdrücklich sei darauf hingewiesen, dass man mit dem letzten Quecksilberniederschlag des Allantoins aus Menschenharn nicht so verfahren darf, wie mit dem aus Tierharn erhaltenen, das heisst das in ihm enthaltene Allantoin weder durch N-Bestimmung noch durch Quecksilbertitration bestimmen kann. Im Menschenharn ist die Darstellung des Allantoins unerlässlich.

---

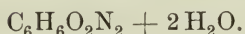


## Anhang.

# Urocaninsäure.

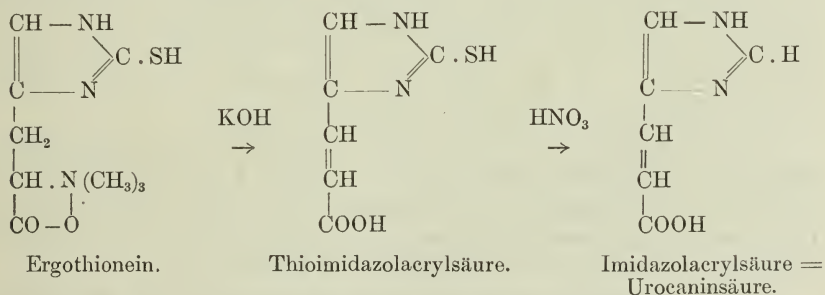
Von A. Ellinger-Königsberg.

## Urocaninsäure.



Synonym:  $\beta$ -Imidazolyl-Acrylsäure.

Die Konstitution der Urocaninsäure hat Hunter aufgeklärt, indem er sie mit der Imidazolaerylsäure identifizierte, die Barger und Ewins<sup>1)</sup> aus Ergothionein, dem Betain des Thiohistidins, durch Einwirkung von Kalilauge und Behandeln der entstandenen Thioimidazolacrylsäure mit Salpetersäure nach folgendem Schema erhielten:



Die Synthese der Säure gelang Barger und Ewins auch durch Einwirkung von Trimethylamin auf  $\alpha$ -Chlor- $\beta$ -imidazolylpropionsäure.

A. Vorkommen. Die Urocaninsäure wurde von Jaffé im Harn eines Hundes, der längere Zeit Fütterungsversuchen mit p-Nitrotoluol gedient hatte, entdeckt. Seitdem ist sie nur einmal wieder im Harn eines Hundes, dem mehrfach tellursaures Natron injiziert worden war, von Siegfried<sup>2)</sup> gefunden worden. Ein Zusammenhang des Vorkommens der Säure mit den Giftwirkungen ist unwahrscheinlich.

<sup>1)</sup> A. Hunter, Journ. of biol. chem. **11**. 536. 1912. — R. Barger und A. J. Ewins, Journ. chem. Soc. **99**. 2336. 1911.

<sup>2)</sup> M. Jaffé, Ber. d. chem. Gesellsch. **7**. 1669. 1874 und **8**. 811. 1875. — M. Siegfried, Zeitschr. f. physiol. Chem. **24**. 399. 1898.



Dass ihr Auftreten im Harn eine höchst seltene Erscheinung ist, geht daraus hervor, dass etwa 20 Jahre hindurch in Jaffés Institut der Harn aller Versuchshunde vergeblich auf Urocaninsäure geprüft wurde. Die Erforschung ihrer Konstitution erhielt einen neuen Anstoss, als Hunter die Säure einmal unter den Produkten einer mehrmonatigen Pankreatinverdauung von Kasein erhielt; die Bedingungen der Darstellung auf diesem Wege liessen sich von Hunter nicht reproduzieren. Eine Angabe von Swain, der eine ähnliche Substanz im Harn des Steppenwolfs (*Canis latrans*) gefunden haben wollte, veranlasste Hunter und Givens<sup>1)</sup> zu einer Nachprüfung. Sie fanden aber weder Urocaninsäure noch einen verwandten Körper in dem untersuchten Falle. In 110 Liter normalen Menschenharns suchte Siegfried vergeblich nach Urocaninsäure.

B. Eigenschaften. 1. Farblose, dünne tetragonale Prismen oder feine, luftbeständige Nadeln. Das Krystallwasser entweicht bei 105°. Löst sich schwer in kaltem, leichter in heissem Wasser, leicht in Eisessig, wenig in Alkohol, nicht in Äther, Aceton, Essigester und Schwefelkohlenstoff. In absolutem Alkohol werden die Krystalle trübe unter Verlust des Krystallwassers und zerfallen. Der Schmelzpunkt (unter Zersetzung) liegt nach Jaffé bei 212—213°, er schwankt mit der Schnelligkeit des Erhitzens, Siegfried gibt 229°, Hunter 224° (korr.) an, Löslichkeit in Wasser: bei 17,4° 0,15%, bei 18,7° 0,16%, bei 50° 0,77%, bei 63° 0,96% der wasserfreien Substanz (Siegfried). Die Säure ist optisch inaktiv (Hunter).

2. Die Lösung der Säure rötet Lackmus. Sie löst kohlensaures Barium und bildet mit vielen Oxyden zum Teil krystallisierende Salze. Sie fällt mit Sublimat und mit Silbernitrat; der Silberniederschlag vermehrt sich bei genauer Neutralisation mit Ammoniak, löst sich aber im geringsten Überschuss von Ammoniak oder Salpetersäure.

Die Urocaninsäure verbindet sich auch mit Mineralsäuren zu krystallisierenden Salzen, dagegen nicht mit organischen Säuren (Essigsäure, Oxalsäure). Das salzsaure Salz  $C_6H_6N_2O_2 \cdot HCl$ , krystallisiert aus heisser Salzsäure in feinen nadelförmigen, rhombischen Plättchen, ist luftbeständig, in Wasser äusserst leicht löslich. Das salpetersaure Salz,  $C_6H_5N_2O_2 \cdot HNO_3$ , fällt auf Zusatz von Salpetersäure zu einer wässrigen Lösung der Urocaninsäure in sichelförmig gebogenen, an den Enden gefranzten Plättchen, ist in verdünnter Salpetersäure fast unlöslich, ebenso in Alkohol, dagegen leicht in Wasser. Beim Erhitzen verpufft es unter Bildung roter Dämpfe. — Das schwefelsaure Salz,  $2C_6H_6N_2O_2 \cdot H_2SO_4$ , krystallisiert aus heisser verdünnter Schwefelsäure in mikroskopischen Nadeln und Plättchen, löst sich schwer in kaltem Wasser, nicht in Alkohol und scheint beim Waschen mit Wasser Säure zu verlieren (Jaffe). — Das Phosphorwolframat löst sich in heissem Wasser und krystallisiert daraus in kleinen Würfeln oder kurzen rechteckigen Prismen. — Das Pikrolonat fällt mit wässriger

<sup>1)</sup> R. E. Swain, Amer. Journ. of Physiol. 13. 30. 1905. — A. Hunter and M. C. Givens, Journ. of biol. chem. 8. 449. 1910.

Pikrolonsäure gelatinös, aus alkoholischer Lösung körnig, schwer löslich in kochendem absol. Alkohol, leichter in kochendem Wasser, am besten in kochendem verdünntem Alkohol. Es krystallisiert in glänzenden gelben Nadelbüscheln, aus 25 %igem Alkohol in gelben rhombischen Plättchen. Es färbt sich bei 230° dunkel und zersetzt sich bei 268° (korr.). — Das Pikrat fällt allmählich beim Zusammenbringen der gesättigten Lösungen in gelben irisierenden Prismen, die bei 224–225° (korr.) schmelzen (Hunter).

Das Baryumsalz  $(C_6H_5N_2O_2)Ba + 8H_2O$  erhielt Siegfried folgendermaßen: Die Säure wurde in überschüssigem Barytwasser gelöst, die Lösung nach Entfernung des überschüssigen Baryts mit Kohlensäure auf dem Wasserbad eingeeengt und mit Alkohol bis zur Trübung versetzt. Nach zwei Tagen war das Salz fast vollständig in feinen, zu Büscheln vereinigten Nadeln auskrystallisiert. Das sehr leichte Salz verliert 6 Moleküle Wasser über Schwefelsäure und bei 100°, die 2 weiteren bei 150°.

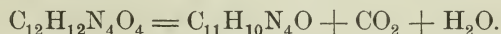
3. Krystallisierte, wasserhaltige Urocaninsäure wird bei gewöhnlicher Temperatur von Eisessig gelöst. Plötzlich scheidet sich ein Brei mikroskopisch feiner Nadeln aus, die aus der Verbindung wasserfreier Urocaninsäure mit Eisessig bestehen, aber kein Acetat sind. Sie verlieren durch anhaltendes Waschen mit Äther Essigsäure und lassen sich bei 60° zu wasserfreier Urocaninsäure trocknen (Siegfried).

4. Die Säure gibt eine intensive Rotfärbung mit Diazobenzolsulfosäure (s. Histidin S. 633, 11.) (Hunter).

5. Sie reduziert kalte alkalische Kaliumpermanganatlösung unter sofortiger Abscheidung von Braunstein (Hunter).

6. Sie entwickelt mit salpetriger Säure keinen Stickstoff (Hunter).

7. Bei und schon unter ihrem Schmelzpunkt zersetzt sich die Urocaninsäure trocken erhitzt unter stürmischer Entwicklung von Kohlensäure und Abgabe von Wasser in eine Base, die Jaffe Urocanin nannte. Die Base konnte bisher ebensowenig wie eines ihrer Salze krystallinisch erhalten werden. Das Platinsalz gab auf die Formel  $C_{11}H_{10}N_4O \cdot H_2PtCl_6$  stimmende Werte, so dass Jaffe den Vorgang folgendermassen formulierte:



und der Urocaninsäure die Formel  $C_{12}H_{12}N_4O_4$  gab. Durch die von Hunter ausgeführte Molekulargewichts- und Konstitutionsbestimmung ist die doppelte Formel hinfällig geworden, und die Untersuchungen über die Entstehung der Base bedürfen der Wiederholung. Das Urocanin liefert nach Siegfried mit ammoniakalischer Silberlösung einen amorphen Niederschlag, ebenso mit Kupfersulfat und Natriumbisulfat oder mit alkalischer Kupferlösung und Hydroxylamin.

8. Siegfried beschrieb mehrere Einwirkungsprodukte des Broms auf Urocaninsäure, von denen aber keines krystallinisch erhalten wurde.

C. Darstellung und Nachweis. Der Urin wird auf dem Wasserbad zum Sirup eingedampft und wiederholt mit heissem Alkohol extrahiert. Von den vereinigten Auszügen wird nach 12—24 stündigem Stehen der Alkohol abdestilliert, der Rückstand mit verdünnter Schwefelsäure (1:4) stark angesäuert und mehrmals mit grossen Portionen Äther ausgeschüttelt. Nach dem Abgiessen der ätherischen Lösung ist der angesäuerte Harnrückstand fast zu einem Brei von Krystallen erstarrt, die abgesaugt, mit wenig kaltem Wasser gewaschen, mit Alkohol von anhaftendem Harnstoff befreit und durch einmaliges Umkrystallisieren farblos erhalten worden. Das so erhaltene Sulfat wird in heissem Wasser gelöst, mit Barytwasser die Schwefelsäure genau ausgefällt und heiss filtriert. Beim Erkalten krystallisiert die Säure aus. Aus dem Sulfat kann sie auch durch Lösen in Ammoniak und Ausfällen mit Essigsäure erhalten werden. Sie wird durch Umkrystallisieren aus Wasser gereinigt (Jaffe).

Vollständiger erhält man die Säure nach Siegfried, wenn man den von Phosphaten durch Baryt- oder Kalkhydrat befreiten Harn mit Chlorzink ausfällt und den Niederschlag entweder mit Schwefelwasserstoff oder mit Barythydrat zersetzt.

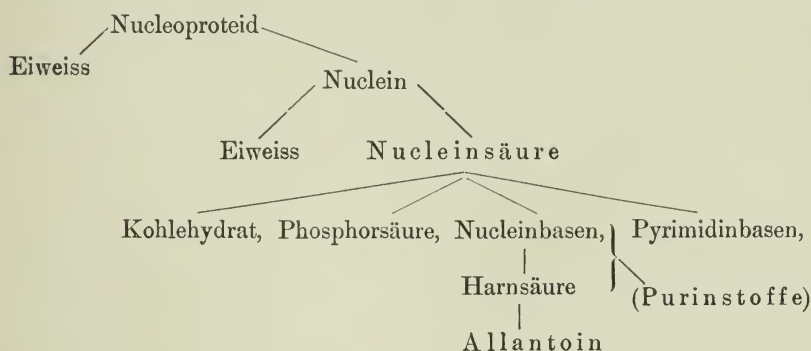
Zur Identifizierung dient die sub B. 2. beschriebene charakteristische Form des salpetersauren Salzes (Mikrophotogramme s. bei Hunter), sowie die sub B. 3., 4. und 5. angeführten Reaktionen.

---

# Nucleinsäure.

Von W. Wiechowski-Prag.

Die Beziehung dieser Stoffe zueinander ergibt sich aus folgendem Schema, welches die Hydrolyse der Nucleoproteide und das weitere Schicksal der primären Spaltungsprodukte im Organismus darstellt.



Die Nucleoproteide sind zusammengesetzte Eiweisskörper, welche aus Eiweiss und der nicht eiweissartigen Nukleinsäure bestehen. Sie sind wesentliche Bestandteile der tierischen und pflanzlichen Zellkerne. Ob sich ihr Vorkommen aber auf die Kerne beschränkt, ist nicht sicher. Nucleoproteide sind aus fast allen Organen dargestellt worden, doch sind die Ausbeuten sehr verschieden und oft gering, zumeist dem Zellreichtum der Objekte entsprechend. Desgleichen enthalten die Spermatozoenköpfe, die Eiterzellen, Leucocyten und die Kerne der Vogel- und Reptilienerythrocyten Nucleoproteide<sup>1)</sup>. Von pflanzlichen Nucleoproteiden ist wenig bekannt. Doch ist anzunehmen, dass die aus verschiedenen Pflanzen dargestellten Nucleinsäuren in den Zellen als Nucleoproteide an Eiweiss gebunden sind (Hefe, Weizenembryonen), wie auch die nicht methylierten Purine, die in manchen Pflanzenprodukten (z. B.

<sup>1)</sup> Literatur ausführlich bei A. Schittenhelm und K. Brahm, Handb. d. Biochemie, hgg. v. C. Oppenheimer, Jena, G. Fischer 1. 603 ff. 1909.



Leguminosensamen) reichlich vorhanden sind, in letzter Linie wohl Nucleoproteiden ihre Entstehung verdanken<sup>1)</sup>. Über das Vorkommen nucleoproteidartiger Eiweissstoffe im Harn siehe S. 1179.

Man unterscheidet a- und b-Nucleoproteide, je nachdem sie aus den Organen durch indifferente Extraktionsmittel oder durch Auskochen erhalten worden sind. Die b-Nucleoproteide entstehen aus den a-Proteiden durch Abspaltung eines leicht koagulierbaren Eiweissanteiles. Aus den in einer dieser Weisen gewonnenen Extrakten werden die Nucleoproteide durch verdünnte Säuren (organische wie anorganische) gefällt oder können ausgesalzen werden.

**Eigenschaften.** Die Nucleoproteide sind weisse, amorphe, nicht hygroskopische, pulverförmige Stoffe, leicht löslich in Alkalien, wenig löslich in Wasser und Salzlösungen, unlöslich in Alkohol und Äther. Ihre wässerigen Lösungen reagieren sauer. Sie werden durch Hitze koaguliert und aus ihren Lösungen durch Salze, bei wechselnden Konzentrationen, und durch Säuren gefällt; letztere Fällungen lösen sich im Überschusse des Fällungsmittels teilweise oder ganz wieder auf. Die Nucleoproteide sind optisch aktiv, meist rechtsdrehend (Pankreas-, Thymus-, Nebennieren-Nucleoproteid), durch Pepsin-Salzsäure werden sie unter Lösung eines Eiweissanteiles gespalten, wobei die Nucleine<sup>2)</sup> entstehen.

**Erkennung.** Die Nucleoproteide werden an ihren Lösungsverhältnissen und Spaltungsprodukten erkannt. In der durch mehrstündiges Kochen mit 2—5%iger Schwefelsäure erhaltenen Flüssigkeit sind nach Entfernung des unzersetzten Eiweisses Purinbasen nachweisbar. Dieser Befund ist ausschlaggebend. Die Asche der Nucleoproteide enthält Phosphorsäure, doch ist dieses Verhalten nicht auf die Nucleoproteide beschränkt, sondern kommt auch anderen Eiweisskörpern zu.

Die Nucleine kommen im Organismus nicht präformiert vor. Sie werden bei der peptischen Verdauung der Nucleoproteide als unlösliche Rückstände erhalten. Sie sind amorphe, weisse Pulver, in Wasser, verdünnten Säuren, Alkohol und Äther unlöslich, löslich in Alkalien (in Barythydrat ganz unlöslich). Sie sind stärkere Säuren als die Nucleoproteide und haben eine starke Affinität zu Farbstoffen, insbesondere basischen. Bei ihrer weiteren Aufspaltung durch Fermente oder Alkalien entstehen unter Hydrolyse eines letzten Eiweissanteiles Nucleinsäuren.

<sup>1)</sup> Über bakterielle Nucleoproteide s. A. Lustig und G. Galeotti, *Lo Sperimentale* 63. 777. (1911).

<sup>2)</sup> L. Lilienfeld, *Archiv f. Anat. u. Physiol.* 1892. 128.

### Nucleinsäuren.

Die Nucleinsäuren sind als Teilstücke der Nucleoproteide wesentliche Bestandteile der tierischen und pflanzlichen Zellen. Einige der hier zu besprechenden Substanzen werden aber im Organismus als intermediäre Abbauprodukte auch in freiem Zustande angetroffen.

Das Kennzeichnende aller zur Gruppe der Nucleinsäuren gehörigen Stoffe ist die Natur ihrer hydrolytischen Spaltungsprodukte. Diese sind: Phosphorsäure, Kohlehydrat, Purinderivate und Pyrimidinderivate. Doch finden sich in den einzelnen Gliedern der Gruppe diese Bestandteile nicht immer alle oder in gleicher Anzahl vor, so dass hier eine ganze Reihe chemisch und biologisch nahe verwandter Substanzen von komplizierteren zu einfachen verfolgt werden kann, als deren gemeinsames und für den hier behandelten Gegenstand ausschlaggebendes Merkmal lediglich der Gehalt an Purinstoffen hervortritt. Diese im Nucleinsäuremolekül vorgebildeten Purinstoffe sind die Aminopurine: Guanin und Adenin. Alle anderen im Organismus aufgefundenen Purine sind sekundär aus jenen entstandene Produkte.

Es ist sehr wahrscheinlich geworden, dass einerseits die Nucleinsäuren der tierischen Zellen: Sperma, Thymus, Milz, Pankreas etc. und andererseits die bisher näher untersuchten Nucleinsäuren des Pflanzenreichs, die Hefe- und die Triticonucleinsäure untereinander identisch sind und dass sich beide Typen vielleicht nur durch die Natur der Kohlehydratgruppe voneinander unterscheiden. Diese Nucleinsäuren enthalten die genannten Bestandteile alle. Ausser ihnen gehören aber hierher weiter zwei einfacher gebaute Säuren: die Guanylsäure und die Inosinsäure, welche bloss aus Kohlehydrat, Purinderivat und Phosphorsäure bestehen. Man kann sie als Produkte eines teilweisen Abbaus der höheren Nucleinsäuren auffassen, wie das P. A. Levene und W. A. Jacobs getan haben, welche Autoren sie in Anlehnung an die Nomenklatur der Eiweisspaltlinge als Nucleotide bezeichnen. Diese Stoffgruppe ist dadurch gekennzeichnet, dass ihre Angehörigen neben Kohlehydrat und Phosphorsäure nur einen der N-haltigen (Purin- oder Pyrimidin-) Ringe der höheren Nucleinsäuren enthalten. Schliesslich kommen hier noch Stoffe in Betracht, die zuerst als Produkte einer partiellen Hydrolyse der Nucleinsäuren und Nucleotide erhalten, von denen neuerdings aber auch einzelne als Produkte des tierischen oder pflanzlichen Stoffwechsels im Organismus gefunden worden sind, Stoffe, die nur mehr aus je einem Molekül Kohlehydrat und einem der N-haltigen Ringe der Nucleinsäure bestehen. Sie werden von P. A. Levene und W. A. Jacobs wegen ihrer wahrscheinlichen Glykosidnatur Nucleoside genannt. Von diesen kommen für

uns nur die bereits genauer gekannten und untersuchten purinhaltigen Nucleoside in Betracht: Guanosin, Adenosin und deren Desaminoderivate: Xanthosin und Inosin<sup>1)</sup>.

Alle diese Stoffe sind hier kurz zu besprechen, weil sie alle Purinstoffe enthalten und es nicht ausgeschlossen ist, dass ausser der Harnnucleinsäure, deren Natur noch nicht festgestellt ist, und dem Carnin noch andere dieser Substanzen im Harn aufgefunden werden.

Die Umrisse der chemischen Konstitution der zur Gruppe der Nucleinsäuren gehörigen Substanzen ergeben sich aus dem Vorstehenden. Die Nucleinsäuresubstanzen sind alle nach einem gemeinsamen Typus gebaut, welchem die Nucleotid-Struktur zukommt. Ein Phosphorsäure-Molekül ist durch ein Kohlehydrat-Molekül an einen N-haltigen Ring geknüpft. Die Variationen entstehen durch Verschiedenheit der N-Ringe und Zahl der zu grösseren Komplexen zusammentretenden Nucleotide, oder anders ausgedrückt die Nucleinsäuren bestehen aus durch Phosphorsäure-Moleküle miteinander verbundenen Nucleosiden.

**Allgemeine Eigenschaften.** Die Nucleinsäuren sind amorphe Substanzen und bilden lebensolche Salze. Einige Salze der Inosinsäure krystallisieren jedoch und die Nucleoside, denen mangels der Phosphorsäuregruppe der Säurecharakter abgeht, sind schon gut krystallisierte Stoffe. Die Nucleinsäure-Substanzen sind optisch aktiv. Die Löslichkeiten sind verschieden. In Wasser sind alle löslich, die niederen Glieder auch in Alkohol. Die Nucleinsäuren werden durch Bleizucker gefällt, die Nucleoside und die Nucleotide erst von Bleiessig und Ammoniak.

In vitro werden die Nucleinsäuren und die Guanylsäure aus den Nucleoproteiden, Nucleinen oder unmittelbar aus den nucleoproteidhaltigen Zellen durch Alkalihydrolyse in Lösung erhalten, aus der die Salze durch Alkohol, die freien Säuren durch Mineralsäure abgeschieden werden<sup>2)</sup>. Weitere Alkalihydrolyse unter Druck spaltet Phosphorsäure ab und führt zu den Nucleosiden<sup>3)</sup>. Säurehydrolyse spaltet von vornherein die Nucleoproteide und Nucleinsäuren wie auch die Nucleotide und Nucleoside in die letzten Bausteine auf (Aminopurine, Kohlehydrate, Pyrimidinbasen und Phosphorsäure).

**Schicksal im Organismus.** Beim Fermentversuch mit überlebenden Organen werden die zugefügten und die organeigenen,

<sup>1)</sup> P. A. Levene und W. A. Jacobs, B. B. **42**. 2474 (1909) **44**. 1027 (1911) Bioch. Z. **28**. 126 (1910). P. A. Levene und F. B. La Forga, B. B. **43**. 3164 (1910). Samuel Amberg und W. Jones, Zeitschr. f. ph. Ch. **73**. 407 (1911).

<sup>2)</sup> A. Neumann, Arch. f. Anat. und Physiol. 1898. 374. 1899. Suppl. 552. O. Schmiedeberg, Arch. f. exper. Pathol. und Pharm. **57**. 309. 190 (1907).

<sup>3)</sup> P. A. Levene u. W. A. Jacobs l. c.

aus den Nucleoproteiden durch Autolyse abgespaltenen Nucleinsäuren in ähnlicher Weise wie durch Hydrolyse im Glase zerlegt. Es treten freie Purinbasen und Phosphorsäure auf<sup>1)</sup>. Die die Nucleinsäuren zerlegenden Fermente, die Nukleasen (Iwanoff<sup>2)</sup>) sind ubiquitäre Fermente. In den Wasserauszügen fast aller tierischer Organe, in Hefe, Schimmelpilzen, Bakterien und höheren Pflanzen sind sie gefunden worden: in Extrakten von Darmschleimhaut<sup>3)</sup>, im Presssaft von Pankreas und Kalbsthymus<sup>4)</sup>, in allen kindlichen Organen<sup>5)</sup>, in Leber und Eingeweiden von *Macacus rhesus*<sup>6)</sup>, in der Leber von *Scyllium catulus*<sup>7)</sup>, in Pankreas, Leber, Niere, Herz und Dünndarmschleimhaut vom Hunde<sup>8)</sup>, im Dünn- und Dickdarm<sup>9)</sup>. Nach dem Nucleasgehalt ordnen sich die tierischen Organe in folgende Reihe: Leber, Milz, Schilddrüse, Pankreas enthalten viel, Gehirn, Nebennieren, Lunge, Lymphdrüsen weniger; in Herz, Blut, Muskel und Serum ist nur wenig Nuclease enthalten<sup>10)</sup>. Nucleasen wurden ferner gefunden in Schimmelpilzen<sup>11)</sup>, in Bakterien<sup>12)</sup> und in der Hefe<sup>13)</sup>. Die erste Stufe des fermentativen Nucleinsäureabbaus ist durch den Verlust des Gelatinierungsvermögens, welches manche Nucleatlösungen auszeichnet, charakterisiert. Weiter lassen sich dann bald Purinbasen und Phosphorsäure nachweisen und das Reduktionsvermögen der Lösung nimmt deutlich zu.

Zum Nachweis der Nuclease bedient man sich in letzter Zeit einer Methode von Pighini<sup>14)</sup>, welche auch Neuberg<sup>15)</sup> empfiehlt. Eine 2%ige Lösung von Hefenucleinsäure (Böhringer) dreht wie eine 3%ige Dextroselösung. Bei Gegenwart von Nuclease kann man eine ununterbrochene Abnahme der Drehung beobachten. Besonders stark soll menschliches Blutserum wirken. Amberg und Jones

<sup>1)</sup> Salkowski, Zeitschr. f. ph. Ch. 13. 506. F. Kutscher, ebenda 32. 59. (1900) 34. 114. (1901). Hahn u. Geret, Z. f. Biol. 34. 117.

<sup>2)</sup> Zeitschr. f. ph. Ch. 39. 31.

<sup>3)</sup> A. Raki, Zeitschr. f. ph. Ch. 38. 84. (1903).

<sup>4)</sup> Fr. Sachs, ebenda 46. 337. (1905).

<sup>5)</sup> A. Schittenhelm u. J. Schmid, Zeitschr. f. ex. Path. u. Therap. 4. 424. (1907).

<sup>6)</sup> H. Gideon Wells, Journ. biol. Ch. 7. 171. (1910).

<sup>7)</sup> V. Scaffidi, Bioch. Zeitschr. 25. 196. (1910).

<sup>8)</sup> P. A. Levene u. F. Medigreceanu, Journ. biol. Ch. 9. 65. (1911).

<sup>9)</sup> T. Wakabayashi u. J. Wohlgemuth, Intern. Beitr. z. Path. u. Th. der Ernährungsstörungen. 2. 519.

<sup>10)</sup> A. Juschtschenko, Bioch. Zeitschr. 31. 377. (1911).

<sup>11)</sup> S. Iwanoff, Zeitschr. f. ph. Ch. 39. 31. (1903).

<sup>12)</sup> H. Plenge, ebenda 39. 190. (1903). — A. Schittenhelm u. F. Schrötter, ebenda 39. 203. (1903); 40. 62. (1903); 45. 284. (1904).

<sup>13)</sup> K. Shiga, Zeitschr. f. ph. Ch. 42. 502. (1904).

<sup>14)</sup> Ebenda 70. 85. (1910).

<sup>15)</sup> Bioch. Zeitschr. 30. 505. (1911).



machen demgegenüber darauf aufmerksam, dass die Drehung der Nucleinsäurelösung bei Temperaturerhöhung stark sinkt, schon Schwankungen der Zimmertemperatur bedingen grosse Abnahmen. Amberg und Jones konnten bei Digestion von Nucleinsäure mit Blutserum weder das Auftreten von Phosphorsäure, noch das von Purinbasen beobachten, so dass, wenn durch die Abnahme der Rechtsdrehung überhaupt eine Zersetzung der Nucleinsäure angezeigt wird, diese Zersetzung ganz anderer Natur sein müsste, wie die bisher durch Nucleasen beobachtete<sup>1)</sup>.

Die weitere Analyse der Vorgänge bei der fermentativen Nucleinsäurespaltung hat aber ergeben, dass zwei Nucleasen vorhanden sind. Eine, welche die Nucleinsäuren in Nucleoside und Phosphorsäure zerlegt (Phosphornuclease) und eine zweite, welche primär die (Amino-) Purine in Freiheit setzt (Purinnuclease)<sup>2)</sup>. Die gebildeten Nucleoside werden durch zwei voneinander verschiedene Nucleosiddesamidasen (Guanosin- und Adenosindesamidase) in Xanthosin und Inosin übergeführt, welche ihrerseits schliesslich durch zwei Hydrolasen (Xanthosinhydrolase und Inosinhydrolase) zu Xanthin bzw. Hypoxanthin abgebaut werden. Die Nucleosiddesamidasen und Nucleosidhydrolasen sind zum Unterschied von den Nucleasen nur auf einzelne Organe beschränkt und kommen ebenso wie die Purindesamidasen durchaus nicht immer zusammen vor. (Über die Verteilung aller dieser Fermente auf die einzelnen Organe siehe die Tabelle auf S. 927.) — Das Vorhandensein dieser Fermente wurde daraus erschlossen, dass man verschiedene Spaltungsprodukte erhält, je nachdem man die Nucleinsäuren und Organe entweder als solche oder nach vorgängiger kurzer Autolyse bzw. Fermentation mit Säuren kocht. Bei der primären Säurehydrolyse entstehen fast ausschliesslich die im Nucleinsäuremolekül vorgebildeten Aminopurine. Bei der Autolyse und der Nucleinsäurefermentation erhält man dagegen Oxypurine. Säurehydrolyse des primären Autolysats (mit oder ohne vorgängigen Zusatz von Nucleinsäuren) liefert nach Beendigung der Phosphorsäureabspaltung neue Purinmengen und zwar Oxy- und Aminopurine. Diese müssen also in einer durch Säuren spaltbaren, phosphorsäurefreien Verbindung vorhanden gewesen sein: als Amino- und Oxynucleoside, von denen die letzteren, da die Nucleinsäuren nur Aminopurine enthalten, durch Desaminierung aus den ersteren entstanden sein müssen. Der Befund, dass auch solche Organe bei der Autolyse Hypoxanthin bilden, welche zugesetztes Adenin nicht zu Hypoxanthin zu desaminieren vermögen, wird so verständlich.

<sup>1)</sup> Journ. biol. Ch. 10. 81. (1911).

<sup>2)</sup> W. Jones, Journ. biol. Ch. 9. 169. (1911). S. Amberg u. W. Jones, Zeitschr. f. ph. Ch. 73. 407. (1911).

Ausserdem beweist dieser Befund das Vorhandensein einer Nucleosid-desamidase<sup>1)</sup>.

Im Magen werden die Nucleoproteide höchstens bis zur Nucleinstufe verdaut. Präformiert eingeführte Nucleinsäuren werden weder verändert noch resorbiert<sup>2)</sup>. Im Darm werden die Nucleoproteide unter Freiwerden der Nucleinsäuren zerlegt und zwar durch das Trypsin. Die in Freiheit gesetzten Nucleinsäuren werden im Darm nun gespalten. An dieser Spaltung ist das Trypsin nicht, das Erepsin vielleicht beteiligt<sup>3)</sup>. Ein kleiner Teil der Nucleinsäuren wird im Darm unter Auftreten freier Purine zerlegt, ein grösserer unter Bildung dialysabler Produkte, welche Purinbasen gebunden enthalten<sup>4)</sup> (Nucleoside?). Die Resorption geht im unteren Jejunum und Ileum vor sich<sup>4)</sup>.

Für den weiteren Stoffwechsel gehen aus diesen Spaltungen der Nucleinsäuren, sowohl der Nahrungsnucleinsäuren als der in den Organen bei deren Tätigkeit und Abnützung entstehenden, Oxypurine und Aminopurine hervor und zwar allem Anscheine nach weit mehr Oxy- als Aminopurine.

Die im vorstehenden kurz zusammengefassten neueren Befunde über die Art und Weise wie die Nucleinsäuren im Körper zerfallen, sind von grösster Wichtigkeit für die Beurteilung zweier bisher schwer verständlicher Tatsachen: 1. dass der Mensch kein Adenin im Harn in irgend erheblicher Menge ausscheidet, wiewohl er es mit den Nucleoproteiden der Nahrung aufnimmt und in seinen Organen selbst enthält, aber in seinen Organen so gut wie kein adenindesaminierendes Ferment nachgewiesen werden kann; 2. dass das Schicksal der als solche eingeführten Aminopurine mindestens in quantitativer Hinsicht ganz anders ist als das der im Nucleinsäuremolekül in den Organismus eingeführten. (Adenin hat sich übrigens bei subkutaner Einführung am Tiere als schweres Gift erwiesen.)

## A. Die Nucleinsäuren im engeren Sinne.

### I. Die tierischen Nucleinsäuren.

Die Nucleinsäuren der tierischen Organe sind alle nach dem Typus der Nucleinsäure der Thymus gebaut, höchstwahrscheinlich

<sup>1)</sup> W. Jones, l. c. S. Amberg and W. Jones l. c.

<sup>2)</sup> E. S. London u. A. Schittenhelm, Zeitschr. f. ph. Ch. **70**. 10. (1910).

<sup>3)</sup> E. Abderhalden u. A. Schittenhelm, Zeitschr. f. ph. Ch. **47**. 452. (1906). Steudel, ebenda **55**. 408. (1908). M. Nakayama, ebenda **41**. 348. (1904). A. Schittenhelm, Zentralbl. Phys. u. Path. d. Stoffw. 1910. 49.

<sup>4)</sup> Schittenhelm, Zeitschr. f. phys. Ch. **72**. 459. 1911.

mit ihr identisch. Über den Bau der Harnnucleinsäure ist nichts bekannt.

#### a) Die Thymonucleinsäure.

Die Analysen ergaben:  $C_{43} H_{61} O_{34} N_{15} P_4 + H_2O^{1)}$ .

C 37,18 %, H 4,14 %, N 15,17 %, P 8,94 % (H. Steudel)<sup>2)</sup>

C 36,65 %, H 4,67 %, N 15,17 %, P 9,37 % (O. Schmiedeberg)<sup>3)</sup>.

1. Sie enthält je ein Molekül Adenin, Guanin, Thymin und Cytosin und je 4 Moleküle Phosphorsäure und Hexose.

2. Sie ist eine weisse, amorphe, leicht zersetzliche Substanz, leicht löslich in den fixen Alkalien, Ammoniak, den Alkali-Carbonaten und Acetaten, schwer mit saurer Reaktion löslich in Wasser, unlöslich in Alkohol und Äther.

3. Sie ist eine vierbasische Säure, vermag 4 H-Atome durch Metall zu ersetzen. — Die Alkalisalze sind leicht wasserlöslich und so beständig, dass sich ihre Lösungen unzerstört kochen lassen<sup>4)</sup>. Aus den Lösungen werden sie durch Alkohol nur bei Gegenwart von Na-Acetat gefällt. Die Lösungen geben nur mit Mineralsäuren, nicht mit Essigsäure einen Niederschlag von freier Nucleinsäure. Jedoch fällt nach Mörner (l. c.) auch Eisessig in grossem Überschusse. — Eine wichtige Eigenschaft des nucleinsauren Na, namentlich des aus Thymus dargestellten, ist die Fähigkeit, in mehr als 4 % iger Lösung in der Kälte zu einer steifen Gallerte zu erstarren. Doch tun dies nicht alle Präparate von nucleinsaurem Na. Die Nucleinsäure aus Pankreas liefert nach H. Steudel<sup>5)</sup> kein gelatinierendes Na-Salz. Nach Neumann<sup>6)</sup> sollen zwei Nucleinsäuren bestehen, a- und b-Säure, von denen nur das Salz der a-Säure gelatiniert und die b-Säure aus der a-Säure bei der Darstellung durch längeres Kochen entsteht. Nach O. Schmiedeberg<sup>7)</sup>, welcher das gelegentliche Gelatinieren von Lösungen von nucleinsaurem Kupfer beobachtete, handelt es sich nicht um zwei verschiedene Säuren, sondern um Säure und Säureanhydrid. Nach W. Jones<sup>8)</sup> dagegen um Salze derselben Säure mit verschiedenem Basengehalt. — Die Erdalkalisalze sind schwer, die Schwermetallsalze in Wasser unlöslich. Die Salze lassen sich bei 90—95° ohne Zersetzung trocknen, vertragen aber höhere Temperaturen nicht.

<sup>1)</sup> Abderhaldens Handbuch d. bioch. Arbeitsmethoden II. 575.

<sup>2)</sup> H. Steudel; Zeitschr. f. phys. Chem. 77. 437 (1912).

<sup>3)</sup> Arch. f. exper. Pathol. u. Pharmakol. 57. 328. (1907).

<sup>4)</sup> A. Kossel und A. Neumann, B. B. 27. 2215. 1894.

<sup>5)</sup> Zeitschr. f. physiol. Ch. 53. 539.

<sup>6)</sup> Archiv f. Physiol. Suppl. 1899. 552.

<sup>7)</sup> l. c.

<sup>8)</sup> Journ. of biol. Chemistry 5. 14. 1908/9.

4. Die Lösungen der Salze drehen die Ebene des polarisierten Lichtes nach rechts<sup>1)</sup>. Die spezifische Drehung wechselt stark mit der Verdünnung und der Acidität (W. Jones)<sup>2)</sup>.

5. Die Thymonucleinsäure reduziert Fehlings-Lösung auch nach dem Kochen mit Mineralsäuren nicht; wohl aber erhält man reduzierende Lösungen durch Behandlung mit Salpetersäure in der Kälte<sup>3)</sup>. Wird Nucleinsäure mit rauchender Salzsäure zum Sieden erhitzt, Phloruglucin zugesetzt und abgekühlt, so zeigt die Flüssigkeit eine rote Farbe<sup>4)</sup>, die aber nicht in Amylalkohol übergeht (Unterschied von der echten Pentosenreaktion)<sup>5)</sup>. Mit Orcin erhält man keine Reaktion<sup>6)</sup>. — Die Biuretreaktion ist negativ, ebenso Millons Reaktion auf Eiweiss und die Diazoreaktion<sup>7)</sup>. (Zur Ausführung der Biuretreaktion in sehr empfindlicher Form siehe O. Schmiedeberg l. c. S. 334.)

6. Sie gibt mit Eiweiss bei Gegenwart von Essigsäure eine Fällung; Gerbsäure, Pikrinsäure und Phosphorwolframsäure fällen nicht; wohl aber Mercurinitrat (Mörner l. c.) und Bleizuckerlösung.

7. Sie ist imstande, Purinstoffe (Basen und Harnsäure) in Lösung zu halten und deren Fällung zu verhindern<sup>7)</sup>.

8. Sie fällt Eiweiss sowie Leim aus saurer Lösung, Albumosen weniger vollständig, Pepton (Kühne) gar nicht. Nach Kutscher<sup>8)</sup> gibt die neutrale Lösung eines Nucleinsäuresalzes mit wässriger Albumoselösung einen Niederschlag von Nuclein. Mit dem Eiweiss verbinden sich die Nucleinsäuren in mehreren Verhältnissen.

Versetzt man nach Mörner eine Nucleinsäurelösung mit viel Eiweiss (Blutserum oder Eialbumin), etwa dem Fünffachen der Nucleinsäure, so gibt Essigsäure einen Niederschlag, der sich nach dem Waschen und abermaliger Fällung aus ammoniakalischer Lösung wie Nucleoproteid schon bei einem Zusatz von 0,4% Essigsäure vollständig und auch sehr leicht in Salzsäure löst. Ein mit mehr Nucleinsäure bereiteter Niederschlag aus Blutserum löst sich dagegen selbst in 5%iger Essigsäure nicht und nicht in Salzsäure bei einem Gehalt von 0,4%, verhält sich also wie Nuclein. Ein aus Eialbumin mit überschüssiger Nucleinsäure bereiteter Niederschlag löste sich schon in Salzsäure von 0,2%.

Aus salzarmem Harn wird nach Mörner Eiweiss durch Nucleinsäure ebenso gefällt, wie aus wässriger Lösung.

Für diesen Versuch wurde der Harn von der immer in ihm enthaltenen eiweissfällenden Substanz befreit; er wurde dialysiert, bis er nur noch wenig Chloride enthielt, bis zu 0,2% mit Essigsäure versetzt, mit Chloroform kräftig geschüttelt und das Filtrat mit überschüssigem Serumalbumin ausgefällt. Die

<sup>1)</sup> H. Steudel, Zeitschr. f. physiol. Ch. **55**. 410. 1908.

<sup>2)</sup> A. Neumann, Archiv f. Physiol. 1898. 377.

<sup>3)</sup> H. Steudel, Zeitschr. f. physiol. Ch. **56**. 215. 1908.

<sup>4)</sup> J. Bang, Hofmeisters Beiträge z. chem. Physiol. u. Pathol. **4**. 341.

<sup>5)</sup> R. Burian, B. B. **37**. 708. 1904 und Zeitschr. f. physiol. Ch. **42**. 297. 1904.

<sup>6)</sup> A. Kossel, Archiv f. Anat. u. Physiol. 1893. 164.

<sup>7)</sup> M. Goto, Zeitschr. f. physiol. Ch. **30**. 473. 1900.

<sup>8)</sup> Fr. Kutscher, Zeitschr. f. physiol. Ch. **23**. 118. 1897.



abermals filtrierte Flüssigkeit gab mit Nucleinsäure jetzt einen Niederschlag, welcher nach dem Trocknen 1,06% Phosphor (und 1,64% Schwefel) enthielt.

9. Zersetzungen. Durch Mineralsäuren in der Siedehitze, am besten durch Schwefelsäure von ca. 5% wird die Nucleinsäure in wenigen Stunden vollständig gespalten. Aus der Zersetzungsflüssigkeit sind dargestellt worden: die Purinstoffe: Guanin<sup>1)</sup>, Adenin<sup>2)</sup>, Xanthin<sup>3)</sup>, Hypoxanthin<sup>4)</sup>; die Pyrimidinbasen: Cytosin<sup>5)</sup>, Uracil<sup>6)</sup>, Thymin<sup>7)</sup>, ferner Ameisensäure und Lävulinsäure<sup>8)</sup>, schliesslich Ammoniak und Phosphorsäure; bei der Destillation mit Salzsäure entstehen ferner kleine Mengen von Furfurol<sup>9)</sup>. Nach Entfernung der Phosphor- und Schwefelsäure lässt sich mit Äther Lävulinsäure und ein Teil des Thymins extrahieren. Aus der zurückbleibenden Flüssigkeit fällt Phosphorwolframsäure die Basen (Purine und Cytosin), das Filtrat enthält Uracil und Thymin, welche durch fraktionierte Krystallisation getrennt werden können. Aus der durch Barythydrat zerlegten Phosphorwolframsäurefällung werden die Purinstoffe durch Fällung mit 20%igem Silbernitrat abgeschieden, im Filtrat nach weiterem Silbernitratzusatz das Cytosin durch Barythydrat als Silberverbindung gefällt und schliesslich über das Platindoppelsalz oder das Pikrat gereinigt. Aller Phosphor wird stets als Phosphorsäure erhalten.

Starke Salpetersäure zerlegt Nucleinsäure schon in der Kälte (die doppelte Menge einer Säure von 1,2 sp. Gew.) unter Entwicklung von Stickstoffoxyden. Bei dieser Zersetzung wird in ein bis mehreren Tagen ein krystallinisches Sediment von Guanin und Adenin abgeschieden. Ausser diesen entsteht hierbei kein anderer Purinstoff. Im Filtrat, welches reduziert und rechts dreht, krystallisiert nach Abdampfen der Salpetersäure und Fällung der Phosphorsäure mit Baryt, Thymin und Uracil, die Mutterlauge gibt mit Alkohol eine Fällung von epizucker-saurem Baryum. Ausserdem wird bei dieser Zerlegung Oxalsäure erhalten<sup>10)</sup>. Ebenso soll nach H. Steudel (l. c.) starke Salzsäure wirken. — Daraus geht hervor, dass die primären Produkte der Säurehydrolyse bei Anwendung höherer Temperaturen einer sekundären Veränderung unterliegen, welche im wesentlichen in einer Abspaltung von

<sup>1)</sup> A. Kossel, Zeitschr. f. physiol. Ch. 7. 15. 1882.

<sup>2)</sup> A. Kossel, B. B. 18. N. T. 928. 1885.

<sup>3)</sup> A. Kossel, Zeitschr. f. physiol. Ch. 4. 1880.

<sup>4)</sup> A. Kossel, Ebenda 3. 291. 1879.

<sup>5)</sup> A. Kossel und H. Steudel, Ebenda 37. 177. 1902.

<sup>6)</sup> A. Askoli, Ebenda 31. 561. 1900.

<sup>7)</sup> A. Kossel und A. Neumann, B. B. 27. 2215. 1894.

<sup>8)</sup> A. Kossel, Archiv f. Anat. u. Physiol. 1891. 181.

<sup>9)</sup> v. Fürth und Jerusalem, Hofmeisters Beiträge 10. 179. — H. Steudel, Zeitschr. f. physiol. Ch. 56. 212. 1908.

<sup>10)</sup> H. Steudel, Zeitschr. f. physiol. Ch. 48. 426. 1906.

Ammoniak besteht, wobei Guanin in Xanthin, Adenin in Hypoxanthin übergeht. Auch das Uracil kann man sich auf diese Weise (durch Desamidierung) aus Cytosin hervorgegangen denken.

Durch vorsichtige Anwendung hydrolytischer Prozeduren erhält man Produkte einer teilweisen Zersetzung: Erhitzt man eine Lösung freier Nucleinsäure auf dem Wasserbade gerade so lange, bis mit Mineralsäuren keine Fällung unveränderter Nucleinsäure erfolgt, aber nicht so lange, dass mit Barythydrat eine Fällung von freier Phosphorsäure entsteht, so scheidet sich aus der durch Bariumhydroxyd alkalisch gemachten Flüssigkeit allmählich das gesamte Guanin der in Arbeit genommenen Nucleinsäuremenge aus und Alkohol fällt aus dem Filtrate vom Guanin das Bariumsalz einer Säure, der Thyminsäure<sup>1)</sup> oder des Nucleotins (Nucleotinphosphorsäure)<sup>2)</sup>, welche nach den Analysen den purin-freien Rest der Nucleinsäure (aus Kohlehydrat, Phosphorsäure und Pyrimidinstoffen bestehend) darstellt, während das gesamte Adenin und eine kleine Menge Cytosin im Alkohol gelöst bleiben. Nach H. Steudel und P. Brigl erhält man die Thyminsäure leicht durch Zerlegen der Nucleinsäure mit Salpetersäure in der Kälte im Filtrat von den Purinbasen über eine Bleifällung als alkoholunlösliches Barytsalz<sup>3)</sup>. Sie ist rechtsdrehend und reduziert Fehlings-Lösung kräftig. Die Analysen stimmen annähernd mit der Annahme einer Nucleinsäure, aus der die beiden Purinbasen unter Eintritt von zwei Wassermolekülen entfernt sind. Bei der Hydrolyse dieser Substanz erhält man keine Purinbasen, dagegen Thymin und Uracil in fast theoretischer Ausbeute<sup>3)</sup>. —

Hält man bei der Spaltung der Nucleinsäure auf dem Wasserbade die Temperatur unter dem Siedepunkte, so fällt Salzsäure-Alkohol ein noch höheres Produkt — die Nucleothyminsäure<sup>4)</sup>, welche noch Purine im Molekül enthält. —

Durch Kochen von Thymonucleinsäure aus Milz mit n/10-Schwefelsäure erhielten P. A. Levene und I. A. Mandel<sup>5)</sup> nach Entfernung der Purine mittelst Silbersulfat, mit Barytwasser die Silberverbindung einer alkoholfällbaren Säure, welche ein unlösliches Barytsalz lieferte und die Zusammensetzung einer Thyminglycophosphorsäure hatte. Bei der vollständigen Hydrolyse lieferte sie Thymin und Lävulinsäure.

Die Thymonucleinsäure zerfällt unter dem Einflusse von Organfermenten unter Bildung von Nucleosiden (s. oben S. 1082 c)<sup>6)</sup>. Durch

<sup>1)</sup> A. Kossel und A. Neumann, Zeitschr. f. physiol. Ch. **22**. 74. 1896.

<sup>2)</sup> Alsberg, Archiv f. exper. Pathol. u. Pharm. **51**. 239. 1904.

<sup>3)</sup> Zeitschr. f. physiol. Ch. **70**. 398. 1901.

<sup>4)</sup> A. Neumann, Archiv f. Anat. u. Physiol. Suppl. 1899. 552.

<sup>5)</sup> B. B. **41**. 1905. 1908.

<sup>6)</sup> S. Amberg u. W. Jones, Journ. biol. Ch. **10**. 81. (1911).

Blutserum wird thymonucleinsaures Natrium nicht zersetzt, die Drehung der Lösung wird durch Blutserum von Rind, Hund und Kaninchen nicht geändert<sup>1)</sup>. Die Veränderungen, die sie im Magendarmkanal erleidet, sind oben erwähnt (S. 1082 g).

#### b) Die Harnnucleinsäure.

Vorkommen. Im Harn findet sich nach K. A. H. Mörner<sup>2)</sup> Nucleinsäure in sehr kleiner Menge, in geringerer als die Chondroitinschwefelsäure, wie es scheint in grösserer Menge, als von dem vorhandenen Eiweiss gebunden werden kann. Bisweilen scheint sie zu fehlen.

Nachweis. Man hat zunächst die Nucleinsäure aus dem Harn abzuscheiden und diesem Zweck dient dasselbe Verfahren, durch welches die Chondroitinschwefelsäure aus dem Harn gewonnen wird (Seite 1261). Beide Säuren werden so nebeneinander als Eiweissverbindungen erhalten, und ihnen kann sich, sicher bei ikterischem Harn, auch taurocholsaures Eiweiss beigesellen. Der Nachweis gründet sich auf den Gehalt der Nucleinsäure an Phosphorsäure und an Xanthinbasen. Der Nachweis von Phosphorsäure allein beweist nichts.

Um die Phosphorsäure aufzufinden, muss der Niederschlag mit Soda und Salpeter geschmolzen und die Lösung mit molybdänsaurem Ammon in salpetersaurer Lösung geprüft werden. Dieser bloss qualitative Nachweis hat aber nur dann Wert, wenn das untersuchte Präparat beim Verbrennen für sich keine oder nur Spuren Asche hinterlässt; denn die in der Schmelze gefundene Phosphorsäure kann auch den das Präparat begleitenden anorganischen Salzen entstammen. Einem hieraus entspringenden Irrtum entgeht man durch gleichzeitige quantitative Bestimmung der Asche und der Phosphorsäure; ist die Menge der Phosphorsäure grösser, als in Kalkphosphat von dem Gewicht der Asche enthalten sein kann, so ist man zu der Annahme berechtigt, dass wenigstens der Überschuss als Nucleinsäure vorhanden war, um so mehr als in die Asche ja auch die Schwefelsäure der Chondroitinschwefelsäure und andere anorganische Stoffe eingehen. — Der Niederschlag, welcher bei der Pepsinverdauung des unmittelbar aus dem Harn gewonnenen Präparates entsteht, muss reicher an Phosphorsäure sein, als das ursprüngliche Präparat. Kann man mit beiden Niederschlägen Phosphorsäurebestimmungen ausführen und entspricht der Befund der soeben gemachten Voraussetzung, so ist eine Irrung durch den Aschegehalt des Präparates ausgeschlossen. Eine Verunreinigung der Harnniederschläge durch das gleichfalls phosphorhaltige Lecithin ist nicht ernstlich zu fürchten.

Da der Niederschlag zum bei weitem grösseren Teil aus chondroitinschwefelsaurem Eiweiss besteht, so ist in den Niederschlägen aus Harn nur wenig Phosphorsäure zu erwarten, keineswegs so viel, als das reine Nucleoproteid oder Nuclein enthält. Mörner fand in dem direkt aus Harn erhaltenen Niederschlag 0,04—0,2%, in dem Verdauungsniederschlag 0,4—1% Phosphor.

Der Nachweis von Xanthinbasen in den Niederschlägen bestätigt nicht bloss den aus der Gegenwart der Phosphorsäure gezogenen Schluss in erwünschter Weise, sondern er allein genügt für den Nachweis der Nucleinsäure. Mörner verfuhr dabei in folgender Weise. Es wurde der mittels Serumalbumin aus 8,5 Liter normalem Harn und der direkt aus 1 und 3,6 Liter eiweisshaltigem Harn

<sup>1)</sup> Dieselben, Zeitschr. f. phys. Ch. 73. 407. (1911).

<sup>2)</sup> K. A. H. Mörner, Skandin. Archiv 6. 372. 1895.



(nach Scarlatina) erhaltene Niederschlag mit 0,1 normaler Schwefelsäure erhitzt die neutralisierte Lösung mit Bleiessig gefällt, das überschüssige Blei mit Schwefelwasserstoff entfernt und das Filtrat eingedampft. Dieses gab mit ammoniakalischer Silberlösung einen Niederschlag, der nach dem Waschen in einigen Tropfen Salpetersäure von 1,1 Dichte gelöst wurde. Beim Erkalten schieden sich Nadeln und Gruppen von Nadeln aus.

Das Auftreten eines Niederschlags bei der Verdauung des Niederschlages aus dem Harn allein beweist nichts für die Anwesenheit von Nucleoproteid, denn ein solcher entsteht auch bei der Verdauung von Eiweiss in Gegenwart von Chondroitinschwefelsäure, von Taurocholsäure und Metaphosphorsäure; die Chondroitinschwefelsäure ist aber immer in dem Eiweissniederschlag aus Harn enthalten, während die Nucleinsäure fehlen kann.

Reine Nucleinsäure wird erkannt an der absoluten Eiweissfreiheit, an der Fällbarkeit durch Alkohol nur nach Zusatz von Na-Acetatlösung, an dem Gehalt dieses Niederschlages an organischem Phosphor und an den durch Hydrolyse bzw. Oxydation desselben freiwerdenden Purinstoffen. Für den letzteren Nachweis gibt H. Steudel eine empfindliche, auch mit kleinsten Mengen unter dem Mikroskop ausführbare Probe an. Die fragliche Substanz wird mit Salpetersäure von 1,2 sp. G. zusammengebracht, bei Anwesenheit von Nucleinsäure entsteht in kürzester Zeit eine krystallinische Abscheidung der Nitrate der Purinbasen <sup>1)</sup>.

## II. Die pflanzlichen Nucleinsäuren.

Die bisher näher untersuchten Nucleinsäuren des Pflanzenreichs: die Hefenucleinsäure und die Nucleinsäure aus Weizenembryonen (Triticonucleinsäure) scheinen identisch zu sein <sup>1)</sup>.

Die Hefenucleinsäure hat die empirische Zusammensetzung:



Sie besteht aus je einem Molekül Adenin, Guanin und Cytosin und je 3 Molekülen Pentose und Phosphorsäure <sup>3)</sup>.

Zu ihrer Darstellung aus Hefe hat Neumann (l. c.) ein Verfahren ausgearbeitet, bessere Resultate scheint das Verfahren von Altman zu liefern <sup>4)</sup>.

Bei der Säurehydrolyse wurden erhalten: Guanin, Adenin, Xanthin, Hypoxanthin, Cytosin, Uracil (Pentose) und Phosphorsäure <sup>2)</sup>. Auch hier sind die Desaminoderivate Xanthin, Hypoxanthin und Uracil sekundär entstanden. Zur Darstellung des Cytosins eignet sich am besten Schwefelsäurespaltung, zur Darstellung der Aminopurine Salpetersäure.

<sup>1)</sup> H. Steudel, Zeitschr. f. physiol. Ch. 48. 1906.

<sup>2)</sup> P. A. Levene u. B. La Forga, B. B. 43. 3164. (1910).

<sup>3)</sup> Katharina Kowalewsky, Zeitschr. f. ph. Ch. 69. 240. (1910). Osborn u. Harri, Zeitschr. f. ph. Ch. 36. 85. (1902). A. Kossel, Arch. f. Anat. u. Ph. 1893. 159. P. A. Levene u. W. A. Jacobs, B. B. 42. 2703. (1909).

<sup>4)</sup> Arch. f. Anat. u. Ph. 1889. 527. Suppl.



Nach P. A. Levene, der die Formel:  $C_{38}H_{50}N_{15}O_{29}P_4$  angibt, enthält sie auch Uracil im Molekül vorgebildet<sup>1)</sup>. Die Pentose ist d-Ribose Levene, l. c.).

Mit Kalilauge und Kaliumacetat oder mit Ammoniak im Autoklaven auf 160—190° erhitzt entsteht unter Abspaltung der gesamten Phosphorsäure: Adenosin, Guanosin und Cytidin. Die gleichen Produkte wurden bei der partiellen Hydrolyse der Triticonucleinsäure erhalten<sup>2)</sup>.

Die Hefenucleinsäure dreht die Ebene des polarisierten Lichts nach rechts. Das klar lösliche Natriumsalz von Böhlinger dreht in einer 2%igen Lösung wie eine 2,9%ige Dextroselösung<sup>3)</sup>. Bei der Digestion mit Organen, aber auch (Unterschied zur Thymonucleinsäure) mit Blutserum nimmt die Drehung rasch ab. Ob das Verschwinden der Rechtsdrehung eine Zersetzung anzeigt, ist ungewiss (s. o. S. 1082 f).

## B. Nucleotide.

### I. Guanylsäure.

Die Guanylsäure wurde von I. Bang<sup>5)</sup> entdeckt, welcher ihr die empirische Zusammensetzung:  $C_{44}H_{66}N_{20}O_{34}P_4$  zuschreibt. Der einfachste Ausdruck der analytischen Resultate ist:  $C_{10}H_{14}N_5O_8P$  (H. Steudel und P. Brigl). Die von Bang beschriebene b-Guanylsäure soll nicht existieren, sondern saures guanylsaures Kalium sein<sup>6)</sup>. Die Guanylsäure besteht daher wahrscheinlich nur aus je einem Molekül Guanin, Pentose und Phosphorsäure. Die Pentose ist nach C. Neuberg l-Xylose<sup>7)</sup>, nach P. A. Levene und W. A. Jacobs d-Ribose<sup>2)</sup>.

Bang stellte die Guanylsäure durch Kochen des rein dargestellten Nucleoproteids des Pankreas mit Kalilauge und Fällen des Hydrolysats mit Schwefelsäure dar<sup>5)</sup>. Nach P. A. Levene und W. A. Jacobs kann man zur Darstellung auch die ganze Drüse verwenden. Diese wird nach dem Koagulieren durch Kochen mit Kalilauge und Kaliumacetat über Nacht stehen gelassen. Hierauf wird das Eiweiss mit Pikrinsäure und Essigsäure entfernt und das eiweissfreie Filtrat, welches die Thymonucleinsäure und die Guanylsäure enthält, mit 25%iger Bleizuckerlösung gefällt. Im Filtrat befindet sich die Guanylsäure<sup>8)</sup>.

<sup>1)</sup> P. A. Levene u. W. A. Jacobs, B. B. 43. 3150. (1910).

<sup>2)</sup> P. A. Levene u. W. A. Jacobs, B. B. 42. 2474. (1909) u. 43. 3150. (1910).

<sup>3)</sup> G. Pighini, Zeitschr. f. ph. Ch. 70. 85. (1910).

<sup>4)</sup> C. Neuberg, Bioch. Zeitschr. 30. 505. (1911).

<sup>5)</sup> Zeitschr. f. ph. Ch. 26. 133. 1898.

<sup>6)</sup> Ebenda, 68. 40. (1910).

<sup>7)</sup> B. B. 35. 1467. (1902); Ebenda, 42. 2703. (1909).

<sup>8)</sup> Bioch. Zeitschr. 28. 126. (1910).

Die Guanylsäure ist in Wasser schwer, in Essigsäure unlöslich, dagegen löslich in Salzsäure. Die Alkalisalze sind leicht in Wasser löslich. Sie wird von Gerbsäure, Pikrinsäure (?), Phosphorwolframsäure und Schwermetallsalzen gefällt. Sie hindert die Fällung der Purinbasen mit ammoniakalischer Silberlösung.

Die Millonsche und die Biuret-Reaktion fallen mit ihr negativ aus. Sie ist rechtsdrehend und reduziert Fehlings Lösung nach dem Kochen mit Salzsäure und Entfernen des Guanins.

Durch Erhitzen mit verdünnter Schwefelsäure wird sie in Guanin, Pentose und Phosphorsäure gespalten. Erhitzen einer Lösung des Natriumsalzes im Rohre 4 Stunden auf 135<sup>0</sup> liefert beim Erkalten das tyrosinähnlich krystallisierende Guanosin<sup>1)</sup>.

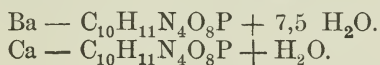
Die meisten Organe, welche Nucleinsäure zerlegen, spalten auch die Guanylsäure<sup>2)</sup>. Die Drehung der Lösung ändert sich nicht, wenn man Guanylsäure mit Schweinepankreas digeriert, wiewohl die Abspaltung von Phosphorsäure die vor sich gegangene Zersetzung anzeigt<sup>3)</sup>.

## II. Inosinsäure.

$C_{10}H_{13}N_4O_8P$ , wurde von Liebig im Fleischextrakt aufgefunden<sup>4)</sup>. Besteht aus je einem Molekül Hypoxanthin, Pentose und Phosphorsäure.

Man erhält sie nach F. Hauser<sup>5)</sup> aus dem mit Alkohol ausgezogenen Extrakt nach Entfernung der reichlich vorhandenen Phosphorsäure über das unlösliche Silbersalz als schön krystallisierendes Bariumsalz, wenn man den durch Schwefelwasserstoff zerlegten Silberniederschlag mit Bariumcarbonat digeriert und das Filtrat langsam bei 80<sup>0</sup> einengt oder in gleicher Weise über das Bleisalz<sup>6)</sup>. Nach letzterer Methode verfuhr schon früher Fr. Bauer<sup>7)</sup>.

Die Inosinsäure ist eine amorphe, leicht zersetzliche Substanz, ihre Salze sind beständig und krystallisieren zum Teil.



Das Silbersalz bildet einen gelatinösen Niederschlag, welcher in Salpetersäure und Ammoniak löslich ist. Auch das Kupfersalz löst sich in Ammoniak.

<sup>1)</sup> B. B. 42. 2469. (1909).

<sup>2)</sup> P. A. Levene u. F. Medigreceanu, Journ. biol. Ch. 9. 65. (1911).

<sup>3)</sup> W. Jones, Journ. biol. Ch. 9. 169. (1911).

<sup>4)</sup> Liebig's Annalen 62. 317. 1897.

<sup>5)</sup> Monatshefte f. Ch. 26. 190.

<sup>6)</sup> Heiser u. Wenzel, Monatshefte f. Ch. 29. 157. 1909.

<sup>7)</sup> Hofmeisters Beitr. 10. 345. 1907.

Die Inosinsäure reduziert Fehlings Lösung nach dem Kochen mit Mineralsäure und Entfernen des entstandenen Hypoxanthins. Sie gibt eine starke Pentosenreaktion mit Orcin oder Phloroglucin.

Ihre spezifische Drehung ist  $\alpha_D^{20} = -18,5^0$ .

Bei der Hydrolyse zerfällt die Inosinsäure in je ein Molekül Hypoxanthin, Phosphorsäure und Pentose. Diese ist nach C. Neuberg und B. Brahm<sup>1)</sup> l-Xylose, nach P. A. Levene und W. A. Jacobs<sup>2)</sup> d-Ribose. Beim Erhitzen des inosinsauren Bariums im Rohre auf  $135^0$  erhält man Inosin<sup>3)</sup>.

Alle Organe des Hundes mit Ausnahme von Pankreas und Blut sind imstande Inosinsäure zu zerlegen<sup>4)</sup>.

### C. Nucleoside.

#### I. Guanosin und Xanthosin.

$C_{10}H_{13}N_5O_5 + 2 H_2O$ , tyrosinähnliche Krystalle. F. P.  $237^0$  (unter Verkohlen)<sup>5)</sup>. Es besteht aus je einem Molekül Guanin und d-Ribose.

In n/10-Natronlauge gelöst  $\alpha_D^{20} = -60,52^0$ .

Das Guanosin findet sich vorgebildet im Pankreas<sup>6)</sup>.

Die als Vernin bezeichnete, im Pflanzenreich verbreitete Verbindung ist identisch mit Guanosin<sup>7)</sup>.

Levene und Jacobs haben das Guanosin durch Erhitzen des hefenucleinsauren Kaliums im Autoklaven auf  $180-190^0$  erhalten. Beim Erkalten der Lösung scheidet sich das Guanosin aus und kann durch Umkrystallisieren gereinigt werden. In analoger Weise haben es die beiden Forscher aus Guanylsäure dargestellt<sup>3) 5)</sup>.

Es entsteht ferner bei der Organautolyse und der Organfermentation von Thymusnucleinsäure und Guanylsäure (Rinder- und Schweinepankreas)<sup>8)</sup>.

Das Guanosin fällt mit Phosphorwolframsäure, Silbernitrat, Bleiessig und Ammoniak und Pikrinsäure.

Mit Salzsäure gekocht und mit Phloroglucin versetzt, entsteht die für Pentosen charakteristische Rotfärbung.

<sup>1)</sup> Bioch. Zeitschr. 5. 449. 1907.

<sup>2)</sup> B. B. 42. 8. 1189 u. 2703. (1909).

<sup>3)</sup> P. A. Levene u. W. A. Jacobs, B. B. 42. 335. u. 1198. (1909).

<sup>4)</sup> P. A. Levene u. F. Medigreceanu, Journ. biol. Ch. 9. 65. (1911).

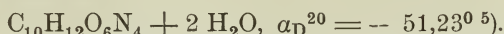
<sup>5)</sup> P. A. Levene u. W. A. Jacobs, B. B. 42. 2469. (1909) u. 2474 (1909).

<sup>6)</sup> Dieselben, Bioch. Zeitschr. 28. 126. (1910).

<sup>7)</sup> E. Schulz u. N. Castoro, Zeitschr. f. ph. Ch. 41. 455. (1904). E. Schulz u. G. Trier, ebenda 70. 143. (1910).

<sup>8)</sup> W. Jones, Journ. biol. Ch. 9. 169. (1911). S. Amberg u. W. Jones, Zeitschr. f. ph. Ch. 73. 407. (1911).

Durch Natriumnitrit und Essigsäure wird Guanosin desamidiert, es entsteht Xanthosin:



Dieselbe Veränderung erleidet es bei der Digestion mit gewissen Organen (z. B. Schweineleber)<sup>6)</sup>.

Mit  $n_{10}$ -Schwefelsäure auf dem Rückflusskühler gekocht zerfällt das Guanosin in d-Ribose und Guanin<sup>1)</sup>.

## II. Adenosin.

$\text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{N}_5\text{O}_4 + 1,5 \text{H}_2\text{O}$ . F. P. 229°. Tyrosinähnliche Krystalle.  $\alpha_{\text{D}}^{20} = -67,30^{\circ}$ . Es besteht aus je einem Molekül Adenin und d-Ribose. (P. A. Levene und W. A. Jacobs, s. bei Guanosin.)

Das Pikrat schmilzt bei 185°.

Es wurde wie das Guanosin von Levene und Jacobs durch Hydrolyse von hefenucleinsaurem Natrium im Rohre aus dem Filtrat vom Guanosin erhalten und über das Pikrat gereinigt.

Es hat ähnliche Reaktionen wie das Guanosin.

Es entsteht wie das Guanosin bei der Autolyse der Organe und der Organfermentation der Thymusnucleinsäure (W. Jones, S. Amberg und W. Jones, s. b. Guanosin)<sup>2)</sup>.

Durch Natriumnitrit und Essigsäure wird es desaminiert und geht in Inosin über<sup>1)</sup>.

Dieselbe Umwandlung erleidet es durch Digestion mit gewissen Organen (W. Jones, S. Amberg und W. Jones, s. bei Guanosin)<sup>2)</sup>.

Durch Kochen mit Schwefelsäure wird es zu Adenin und d-Ribose gespalten (P. A. Levene und W. A. Jacobs, s. b. Guanosin)<sup>3) 4) 5)</sup>.

## III. Inosin und Carnin.

### 1. Inosin.

$\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{N}_4\text{O}_5$  krystallisiert lufttrocken mit  $2\text{H}_2\text{O}$  und schmilzt dann bei 89–90°. Im Exsikkator verliert es alles Wasser und verkohlt dann bei 215°.  $\alpha_{\text{D}}^{20} = -49,2^{\circ}$ . Es ist verhältnismässig leicht in Wasser löslich.

Es besteht aus je einem Molekül Hypoxanthin und d-Ribose<sup>1)</sup>.

Es wurde von F. Hauser und F. Wenzel<sup>6)</sup> im Fleischextrakt entdeckt bzw. aus dem Carnin dargestellt.

<sup>1)</sup> P. A. Levene u. W. A. Jacobs, B. B. 43. 3150. (1910).

<sup>2)</sup> Jones, Amberg und Jones, l. c.

<sup>3)</sup> Levene u. Jacobs, l. c. B. B. 42.

<sup>4)</sup> P. A. Levene u. W. A. Jacobs, B. B. 43. 3150. (1910).

<sup>5)</sup> P. A. Levene u. W. A. Jacobs, B. B. 42. 335. 1198. (1909).

<sup>6)</sup> Monatsh. f. Ch. 29. 157. (1909).



Es entsteht bei der partiellen Spaltung der Inosinsäure (s. d.), und durch Desaminierung des Adenosins durch Nitrit und Organfermente (s. Adenosin).

Säurehydrolyse spaltet das Inosin in d-Ribose und Hypoxanthin<sup>1)</sup>.

## 2. Carnin.

Es kommt nach Pouchet konstant in kleinen Mengen im normalen Harn vor, in grösseren Mengen bei Fieber und bei Affektionen des Nervensystems<sup>1)</sup>. Eine dem Carnin ähnliche Basis traf Salomon<sup>2)</sup> in leukämischem Harn an (aus 35 Ltr. 0,1 g). In 15 Ltr. Hundeharn fand Albanese<sup>3)</sup> eine Spur Carnin.

### Eigenschaften.

1. Lufttrocken  $C_7H_8N_4O_3$ ,  $H_2O$ . Bildet gewissen Formen des kohlensauren Kalkes ähnliche Drusen und Knollen mikroskopischer, unregelmässig begrenzter derber Krystalle; grosse Krystalle lassen sich nicht erhalten. Nach dem Trocknen kreideweiss.

2. Löst sich sehr schwer in kaltem Wasser, leicht in heissem und fällt beim Erkalten leicht wieder aus. Es löst sich schwer in Ammoniak, leicht in Alkalihydrat (Krukenberg und Wagner), leicht in Mineralsäuren (Huppert); seine Lösung reagiert völlig neutral. Alkohol sowie Äther lösen es nicht.

3. Beginnt sich bei 230° zu bräunen und liefert einige Grad darüber ein unbedeutendes Sublimat. Auf dem Platinblech verbrennt es mit bläulicher Flamme unter Verbreitung eines eigentümlichen Geruchs.

4. Wird durch Bleiessig gefällt, jedoch nicht in Gegenwart von Bleizucker (Weidel); der Niederschlag löst sich in der Wärme und tritt beim Erkalten wieder auf.

5. Salzsaures Carnin  $C_7H_8N_4O_3$ ,  $HCl$ . Eine Lösung von Carnin in warmer starker Salzsäure setzt beim Erkalten bald hübsche glasglänzende Nadeln in charakteristischen Rosetten ab. Die wässrige Lösung der Krystalle liefert beim Erkalten zumeist einen Schlamm, der sich erst bei längerem Stehen wieder in Nadeln verwandelt. — Das Chloroplatinat  $C_7H_8N_4O_3$ ,  $HCl$ ,  $PtCl_4$  scheidet sich auf Zusatz von Platinchlorid zur Lösung des Chlorids allmählich als feines sandiges goldgelbes Pulver ab. — Jodwasserstoffsäures Carnin krystallisiert aus einer warmen Lösung von Carnin in concentrirter Jodwasserstoffsäure in Nadeln. — Pikrinsäure gibt keinen Niederschlag.

6. Mit Quecksilberchlorid und mit salpetersaurem Quecksilberoxyd gibt es einen weissen Niederschlag. — Salpetersaures Carnin-Silber  $(C_7H_7AgN_4O_3)_2AgNO_3$  fällt auf Zusatz von salpetersaurem Silber zu einer Carninlösung als flockiger weisser, ziemlich lichtbeständiger Niederschlag, der sich weder in Salpetersäure noch in Ammoniak merklich auflöst.

7. Verwandelt sich beim Erwärmen mit gesättigtem Brom- oder Chlorwasser unter schwacher Gasentwicklung, ferner beim Erwärmen mit Salpetersäure unter ziemlich heftiger Reaktion in Sarkin. Die Zersetzung mit Brom verläuft vielleicht nach der Gleichung



<sup>1)</sup> H. Weidel, Ann. d. Ch. u. Pharm. 158. 353. 1871. — Krukenberg und H. Wagner, Verhandlungen der Würzburger physik. med. Gesellsch. 1883. — A. Gabriel Pouchet, Contributions à la connaissance des matières extractives de l'urine. Thèse. Paris 1880. Parent 28 u. 36.

<sup>2)</sup> Zeitschr. f. ph. Ch. 18. 211.

<sup>3)</sup> Arch. f. exper. Path. u. Pharm. 35. 457.

Der Angabe von Weidel, dass mit Chlorwasser eingedampftes Carnin sich in einer Ammoniakatmosphäre rot färbt, wird von Krukenberg und Wagner widersprochen. Nach Hupperts Erfahrung tritt die Färbung jedoch dann ein, wenn nur wenig Chlorwasser zur Reaktion verwendet wird. — Beim Kochen mit starker Salzsäure färbt sich die Lösung immer stärker braun und schliesslich wird das Carnin unter Ausscheidung brauner Flocken völlig zersetzt. — Wird Carnin mit konzentrierter Jodwasserstoffsäure erhitzt, so bräunt sich die Lösung unter Ausscheidung von Jod und beim Erkalten krystallisiert jodwasserstoffsäures Carnin aus. — Mit Barytwasser lässt sich das Carnin stundenlang ohne Zersetzung kochen.

Nach F. Haiser und F. Wenzel ist das Carnin ein Gemenge von Inosin und Hypoxanthin<sup>1)</sup>.

Bei der Fällung der Purinstoffe im Harn (s. d.) wird das Carnin ebenfalls gefällt und befindet sich nach der weiteren Fraktionierung in der Hypoxanthinfraktion (s. d.) und schliesslich in den Mutterlaugen, welche nach dem Auskrystallisieren der Xanthinbasen aus den ammoniakalischen Lösung übrig bleiben. Man erhält es aus diesen nach Weidel<sup>2)</sup> durch Fällern derselben mit Bleiessig, Auskochen des Niederschlages mit Wasser und Behandeln des Auszuges mit Schwefelwasserstoff. Schliesslich fällt man mit Silbernitrat, wäscht mit Ammoniak und zerlegt wieder mit Schwefelwasserstoff.

In derselben Weise wird das Carnin aus Fleischextrakt oder dem wässrigen Auszug von Pferdefleisch (Balke) dargestellt. Im Filtrat von der Barytfällung des Fleischextrakts wird das Carnin mit Bleiessig gefällt und dem Niederschlage durch siedendes Wasser das Carninblei entzogen. Balke<sup>3)</sup> fällt zuerst das Carnin mit den Purinen als Cu-Oxydulverbindung und fraktioniert die zerlegte Fällung wie oben angegeben mit Blei.

Acetylieren des Carnins und nachfolgende Verseifung liefert Inosin. (F. Haiser und F. Wenzel<sup>4)</sup>.)

<sup>1)</sup> Monatsh. f. Ch. **29**. 157. (1908).

<sup>2)</sup> Annalen d. Ch. u. Pharm. **158**. 356.

<sup>3)</sup> Journ. f. prakt. Ch. (N. F.) **47**. 553. (1893).

<sup>4)</sup> l. c.



# Die Eiweisskörper des Harns.

Von F. N. Schulz-Jena.

A. Allgemeines. Die Eiweissstoffe lassen sich definieren als kolloidale Stoffe, welche die Elemente C, H, N, O, S und unter Umständen auch Fe, P und andere in ziemlich konstanten Mengenverhältnissen enthalten. Sie geben eine Anzahl von Fällungsreaktionen und Farbenreaktionen, die mehr oder weniger spezifisch für die Eiweissstoffe sind und deren man sich daher gern zum Nachweis der Eiweissstoffe bedient. Es ist aber bei der Beurteilung dieser Reaktionen Vorsicht am Platze, so dass man sagen muss, der Beweis für die Gegenwart von Eiweiss kann in zweifelhaften Fällen nur dadurch erbracht werden, dass das Gesamtbild aller Reaktionen sich zu dem vereinigt, was man bei den nachgewiesenen Repräsentanten der Eiweisskörper findet.

Ferner ist es für die Eiweissstoffe charakteristisch, dass sie bei Einwirkung von Säuren, unter gewissen Bedingungen auch von Laugen sowie von Fermenten aufgespalten werden in Aminosäuren. Der Nachweis dieser Aminosäuren nach der Hydrolyse ist eine der sichersten Kriterien für die Eiweissnatur eines fraglichen Stoffes.

## Einteilung der Eiweissstoffe.

Eine Einteilung nach rein chemischen Gesichtspunkten etwa wie bei den Kohlehydraten ist für die Eiweissstoffe zurzeit nicht durchführbar. Nachstehendes Schema ist auf Grund verschiedener physikalischer und chemischer Eigenschaften aufgestellt. Es dient als Notbehelf, solange keine rein chemische Einteilung möglich ist.

I. Proteide. Zusammengesetzte Eiweisskörper, die sich in Eiweiss auf der einen Seite und andere Komplexe auf der



anderen Seite aufspalten lassen. Hierher gehören: Nucleoalbumin (Albumin + Nucleinsäure), Mucin (Eiweiss + Kohlehydrat), Hämoglobin (Eiweiss + Hämatin), Kasein (Eiweiss + P-Komplex).

II. Eigentliche Eiweissstoffe. Dieselben werden unterschieden in Albumine und Globuline im wesentlichen nach ihrem Verhalten beim Aussalzen mit Neutralsalzen.

III. Albuminoide Substanzen, eiweissähnliche Stoffe, die einfacher gebaut erscheinen, wie die eigentlichen Eiweissstoffe, und denen wesentliche Merkmale der eigentlichen Eiweissstoffe fehlen. Hierher gehören vor allem die bei der Verdauung der eigentlichen Eiweissstoffe entstehenden Verdauungsprodukte (Albumosen und Peptone), ferner der Leim, sowie manche Stützsubstanzen (Elastin etc.).

B. Löslichkeitsverhältnisse. a) In salzfreiem Wasser löslich sind Albumin, Pseudoglobulin, Hämoglobin, Methämoglobin, Protalbumose, sekundäre Albumosen, Peptone.

b) Von den in salzfreiem Wasser unlöslichen Eiweisskörpern lösen sich in (schwachen) Neutralsalzlösungen (den neutral reagierenden Salzen der Alkalien und alkalischen Erden, wie Chlornatrium, Magnesiumsulfat etc.) Euglobulin, die mucinähnliche Substanz und Heteroalbumose.

Auch die sub a) genannten in Wasser löslichen Eiweisssubstanzen lösen sich in schwachen Salzlösungen. — Dem rohen Blutfibrin kann durch Salzwasser beigemengtes Globulin entzogen werden.

c) Diese in Wasser unlöslichen Eiweisskörper lösen sich auch in Säuren und in Alkalihydraten, sowie in den alkalisch reagierenden Salzen (kohlen-sauren und phosphorsäuren Alkalien), indem sie mit den Säuren sowohl als mit den Basen lösliche s. g. Salze bilden. Auch die sub a) genannten, in salzfreiem Wasser löslichen Eiweissstoffe bilden unter den gleichen Verhältnissen solche Salze. Typisch für diese Salze sind die des Albumins, von welchen das Salz mit Basis, in welchem das Albumin Säure ist, Albuminat, das Salz mit Säure, in welchem Protein Basis ist, Acidalbumin heisst. Das Acidalbumin reagiert auf Lackmus sauer, das neutrale Albuminat neutral, das saure sauer. Entzieht man einem solchen in Lösung befindlichen Salz die Basis oder die Säure durch Zusatz einer anderen Säure (auch zweifach saures Phosphat) oder Basis (Alkali- oder Erdalkalihydrat, Alkalicarbonat, einfach saures oder normales Phosphat) geradeauf, so fällt der Eiweisskörper wieder aus.

Wie Ramsden<sup>1)</sup> gezeigt hat, werden Eiweisskörper (Serumalbumin, Serumglobulin, krystallisiertes Eialbumin, Casein) durch blosses Schütteln ihrer Lösungen,

<sup>1)</sup> W. Ramsden, du Bois' Archiv 1894. 517; vgl. Ostwald, Ztschr. f. physik. Ch. 15. 704.

auch unter Ausschluss von Luft, in unlöslicher Form abgeschieden, wenn die Lösung nicht zu stark alkalisch oder zu salzhaltig ist. Auf diese Weise konnten bis 96,4% des in Lösung befindlichen Eiweiss abgeschieden werden.

Schüttelt man normalen Harn mit Äther, Chloroform, Amylalkohol, so tritt nach Plósz ein aus mucinähnlicher Substanz bestehender Niederschlag auf. — Nach Boymond<sup>1)</sup> bewirkt Schütteln des eiweisshaltigen Harns mit vermeintlich indifferenten Mitteln (Talk, Presskohle, Kalkcarbonat, Kalkphosphat, gebrannte Magnesia, Magnesiumcarbonat, Wismutsubnitrat) einen Niederschlag von Eiweiss. Das Wismutsalz fällt so Albumin und Globulin vollständig.

C. Koagulation der Eiweissstoffe. Für den Nachweis der Eiweissstoffe ausserordentlich wichtig ist die auf der Kolloidnatur derselben beruhende Eigenschaft, dass dieselben durch verschiedene Agentien aus dem löslichen Zustand in den ungelösten Zustand übergehen können und zwar entweder in Form einer reversibeln Zustandsänderung (z. B. beim Aussalzen) oder in Form einer irreversibeln Zustandsänderung (Koagulation).

1. Eine der wichtigsten irreversibeln Zustandsänderungen ist die Hitzegerinnung (auch Koagulation im engeren Sinne des Wortes).

Von den im Harn vorkommenden Eiweisskörpern geben beim Erhitzen ihrer Lösungen Niederschläge: Albumin, Hämoglobin, Globulin. Diese Koagulation erfolgt bei schwach saurer Reaktion, sowie Anwesenheit einer gewissen Menge von Salzen und zwar schon unterhalb der Siedehitze, aber nicht bei allen bei der gleichen Temperatur.

Die Gerinnungstemperatur lässt sich zur Charakterisierung der Eiweissstoffe verwerten, sowie auch unter Umständen zur Trennung verschiedener Eiweissorten voneinander. Die Koagulationstemperatur ist abhängig von dem Gehalt der Lösung an Eiweiss, Salz, Säure, sowie auch von der Geschwindigkeit des Erwärmens. So schwankt die Gerinnungstemperatur des Serumglobulin bei Variation der angegebenen Faktoren zwischen 68 und 80°. (Näheres siehe bei den einzelnen Eiweissstoffen, sowie auch in dem Abschnitt „Kochprobe“.)

Die Koagulationstemperatur ist nicht nur abhängig von der Art der Eiweisssubstanz, sondern auch von den begleitenden Umständen: der Reaktion der Flüssigkeit, dem Salzgehalt und der Konzentration der Eiweisslösung. Eine Vermehrung des Salzgehalts erhöht meist die Koagulationstemperatur des Albumins und setzt die der Globuline herab. Eieralbumin wird nach Lewith<sup>2)</sup> unlöslich bei einem Wassergehalt der Lösung von 25% bei 74—80°, mit 18% Wasser bei 80—90°, mit 6% bei 145° und wasserfrei bei 160—170°.

Nach Pauli und Handowski erhöhen Salze in sehr niedriger Konzentration den Koagulationspunkt des salzfreien Eiweisses. Erst bei hohem Salzgehalt tritt eine Änderung der Koagulationsbeeinflussung ein; dabei kann je nach der Natur des Anions oder Kations die Koagulierbarkeit erhöht oder herabgesetzt sein. —

<sup>1)</sup> P. Plósz a. a. O. — Boymond, Journ. de Pharm. et de Chem. [5]. 20. 481. Chem. Zentralbl. 1890. I. 99.

<sup>2)</sup> S. Lewith, Arch. f. exp. Pathol. 26. 351. 1890.

Quantitative Fällung erfolgt nur bei einem bestimmten, optimalen Säuregehalt (Herlett, Neumeister, Brunner). In salzfreier Lösung erfolgt keine sichtbare Koagulation, wohl aber eine nachweisbare chemische Veränderung (Starke, Erb)<sup>1)</sup>.

Erwärmt man eine koagulationsfähige Eiweisslösung, so tritt schon unter der Koagulationstemperatur milchige Trübung ein, worauf dann bei höherer Temperatur schnell Abscheidung von Flocken erfolgt. Hält man die Temperatur auf der niederen Höhe konstant, so verwandelt sich die milchige Trübung gleichfalls in Flocken. Sind diese Flocken nur kurze Zeit erwärmt worden, so lösen sie sich (bei Albumin) nach Corin und Ansiaux<sup>2)</sup> beim Abkühlen und Schütteln wieder auf, nach längerem Erwärmen aber erst, nachdem sie durch Filtrieren von der Mutterlauge getrennt worden sind.

Eiweiss, sowie Serumalbumin büssen auf Zusatz von Formaldehyd zu ihren Lösungen nach Blum<sup>3)</sup> die Koagulierbarkeit durch Hitze (und Alkohol, aber nicht die Fällbarkeit durch Alkohol) unter Bewahrung ihrer übrigen chemischen Eigenschaften ein.

2. Koagulation durch Alkohol. In Äthylalkohol sind die in Betracht kommenden Eiweissstoffe unlöslich. Demnach dient Alkohol als Fällungsmittel für die meisten Eiweissstoffe. Die fällende Alkoholkonzentration ist bei verschiedenen Eiweissstoffen verschieden (F. Hofmeister, Tebb). Die Fällung ist zunächst reversibel. Nach kürzerer oder längerer Zeit wird aber bei vielen Eiweissstoffen die Fällung irreversibel, es tritt Koagulation ein. Durch Harnstoff- und andere alkohollösliche Salze wird die Fällbarkeit herabgesetzt (Spiro). — Die höheren Alkohole besitzen ein grösseres Fällungsvermögen (Spiro). Chloroform und Aceton wirken ebenfalls fällend und koagulierend (Salkowski, Weyl)<sup>4)</sup>.

D. Das Aussalzen der Eiweissstoffe. Eiweissstoffe können durch Neutralsalze aus ihren Lösungen ausgefällt werden. Es handelt sich um reversible Fällungen. Praktisch am meisten verwandt werden: Magnesiumsulfat, Ammoniumsulfat, Zinksulfat, Natriumchlorid, Natriumsulfat. Den aussalzbaren Eiweissstoffen kommen bestimmte Fällungsgrenzen zu, wodurch eine Unterscheidung der Eiweissstoffe voneinander vielfach ermöglicht wird.

Im allgemeinen ist zu erwähnen, dass man zur Bestimmung der Fällungsgrenzen mit einem konstanten Gesamtvolum arbeitet, in welchem dann steigende Salzmengen enthalten sind. Man folgt dabei den Vorschriften der Hofmeister-

<sup>1)</sup> W. Pauli u. Handowski, Hofmeisters Beiträge 9. 11. 415. 1908. — W. Pauli, Ebenda 10. 53. 1907. — R. Neumeister, Zeitschr. f. Biologie 24. 272. 1888. — Brunner, Diss. Bern. 1894. — J. Starke, Sitzungsber. d. Ges. f. Morphol. u. Physiol. München 1897. 1. — W. Erb, Zeitschr. f. Biol. 41. 309. 1901; Zentralbl. f. Physiol. 5. 826; Chem. Zentralbl. 1892. 1. 672.

<sup>2)</sup> J. Corin u. Ansiaux, Bull. de l'Acad. roy. de Bruxelles [3] 21. 345; Herlett, Journ. of Physiol. 13. 693. 1892.

<sup>3)</sup> F. Blum, Zeitschr. f. physiol. Ch. 22. 127. 1896.

<sup>4)</sup> F. Hofmeister, Ergebnisse der Physiologie (Asher-Spiro). 1. I. 759, 781. 1902. — Tebb, Journ. of Physiol. 30. 25. 1904. — K. Spiro, Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol. 4. 300. 1903. — E. Salkowski, Zeitschr. f. physiol. Chem. 31. 329. 1901. — Th. Weyl, Ber. d. chem. Gesellsch. 43. 508. 1910.



schen Schule, wonach man auf ein konstantes Gesamtvolum von 10 cem bringt und nun den Sättigungsgrad durch die Anzahl cem konzentrierter Salzlösung ausdrückt, welche in den 10 cem enthalten sind. Man stellt sich z. B. eine Serie in Reagenzgläsern, möglichst von gleicher Weite her, bei welcher in jedem Reagenzglas 1 cem der zu prüfenden Eiweisslösung, ferner steigende Mengen konzentrierter Salzlösung und dann Wasser zu einem Gesamtvolum von 10 cem enthalten sind; würde nun etwa in dem Reagenzglas eine Fällung beginnen, welches 3 cem Salzlösung enthält, so würde die untere Fällungsgrenze des betreffenden Eiweissstoffes bei  $\frac{3}{10}$  Sättigung liegen.

Konzentrierte Eiweisslösungen beginnen etwas früher auszufallen wie verdünnte; die Temperatur ist von Einfluss. Bei saurer Reaktion erfolgt die Fällung in der Regel früher, bei Zusatz von Basen (auch Harnstoff [Spiro]) dagegen später. Details siehe bei den einzelnen Eiweissstoffen.

E. Optische Aktivität. Die Eiweisskörper drehen die Ebene des polarisierten Lichtes nach links.

F. Fällung durch die Salze der Schwermetalle. Im Gegensatz zu den Fällungen durch die Neutralsalze handelt es sich hier um irreversible Fällungen, bei denen sich das Eiweiss wie ein Suspensionskolloid verhält. Geringe Mengen des Schwermetallsalzes bewirken die Fällung; bei zunehmendem Gehalt an Schwermetallsalz wird ein Maximum der Fällung erreicht, und dann kann bei steigendem Salzgehalt die Fällung wieder absinken bis auf Null, d. h. der ursprünglich entstandene Niederschlag kann sich wieder auflösen. Praktische Anwendung finden Quecksilbersalze (Abeles), Eisensalze (Schmidt-Mülheim, Siegfried), Bleisalze (Hofmeister), Kupfersalze (Hofmeister, Neumeister, Siegfried), ferner Zink (Bömer, Zunz), Uranyl (Jakoby, Glaessner), Platin, Kobalt (Chittenden und Witehouse)<sup>1)</sup>. In bezug auf das Verhalten gegenüber solchen Salzen bestehen namentlich wichtige Unterschiede zwischen den gewöhnlichen Eiweissstoffen und den Albumosen bzw. Peptonen. Details s. später.

G. Fällungsreaktionen (Alkaloidreaktionen). Die Eiweisskörper geben selbst in Spuren mit solchen Reagentien Niederschläge, welche auch die Alkaloide fällen (Mylius). Hierher gehören Phosphorwolframsäure, Phosphormolybdänsäure, Tannin, Jodquecksilberjodkalium, Jodwismutjodkalium, Quecksilberchlorid, Pikrinsäure, Pikrolon-

<sup>1)</sup> Abeles, Zeitschr. f. physiol. Ch. 15. 495. 1891. — Schmidt-Mülheim, Arch. f. Anat. u. Physiol. 1880. 33. — M. Siegfried, Zeitschr. f. physiol. Ch. 21. 360. 1895. — F. Hofmeister, ebenda 2. 288. 1878. — R. Neumeister, Zeitschr. f. Biol. 26. 234. 1890. — M. Siegfried, Zeitschr. f. physiol. Ch. 35. 164. 1902. — Bömer, Zeitschr. f. analyt. Ch. 34. 562. 1895. — Zunz, Zeitschr. f. physiol. Ch. 27. 219. 1899. — Jakobi, ebenda 30. 135. 1900. — Glaessner, Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol. 1. 1. 1901. — Chittenden u. Witehouse, Malys Jahrb. f. Tierch. 17. 11. 1887.



säure, welche bei Gegenwart von freier Mineralsäure (zum Teil auch bei Gegenwart von Essigsäure) eiweissfällend wirken. Ferner rechnet hierher Ferrocyanwasserstoff (Ferrocyankalium und Essigsäure), Nitroprussidnatrium in Gegenwart von Essigsäure, Rhodankalium und Essigsäure, Metaphosphorsäure, Trichloressigsäure, Sulfosalicylsäure, Asaprol ( $\beta$ -Naphthol,  $\alpha$ -Sulfonsäure), Aseptol (Orthophenolsulfonsäure) beide in saurer Lösung, Allotellursäure, Wismutsubnitrat und Jodkalium in salzsaurer Lösung (Fron), Uranylacetat (Kowalewski). Natriumsulfantimoniat (Schlippersches Salz) in Gegenwart von freiem Ammoniak; antimonsaures Kali (Palm). Wolframsäure und Molybdänsäure in essigsaurer Lösung (Sonnenschein, Jaworowski). Chromsäure (Kirk, Rosenbach, Guérin, Mandel, Zülzer), Jodjodkalium und Salzsäure (Cohen), Chlorkalk und Salzsäure (Jolles)<sup>1)</sup>.

Die Eigenschaft, Eiweiss zu fällen, kommt noch zu: der Nucleinsäure, den Seifen, dem Lecithin (Altmann)<sup>2)</sup>, sowie der Taurocholsäure und der Chondroitinschwefelsäure.

Diese Substanzen finden als Reagentien keine Verwendung, sind aber darum von analytischer Bedeutung, weil bei ihrer Gegenwart in Eiweisslösungen auf Zusatz von Säure (Essigsäure) Verbindungen derselben mit Eiweiss als Niederschläge auftreten. Chondroitinsäure und Nucleinsäure kommen nach Mörner immer im Harn vor, Taurocholsäure zeitweilig (siehe dort); das Rhodan und die freien Fettsäuren kommen dabei wegen ihres geringen Fällungsvermögens nicht in Betracht, die Fettsäuren und das Lecithin auch deshalb nicht, weil sie nicht oder nur selten in geringer Menge im Harn enthalten sind.

H. Chemische Umsetzungen zwischen Eiweissstoffen und Anilinfarben. Ausgehend von Fragen der histologischen Färbetechnik hat M. Heidenhain<sup>3)</sup> die Wirkung von Anilinfarben auf Eiweiss (insbesondere Serumalbumin und Kasein) untersucht. Aromatische Sulfosäuren wirken bei genügender Acidität eiweissfällend. Dies tun auch die sulfosauren Azofarbstoffe, die gefärbte Eiweissfällungen hervorrufen. Zu den Farbstoffen, welche sehr intensive Eiweissfällungsmittel sind, gehören Abkömmlinge der Naphtholdisulfosäuren und der Naphtholtrisulfosäuren, sowie der Chromtropsäure. Besonders grosse Fällungskraft

<sup>1)</sup> F. Mylius, Ber. d. chem. Gesellsch. **36**. 775. 1903. — Fron, Chem. Zentralbl. 1875. 263. — R. Palm, a. a. O. **26**. 36. — F. L. Sonnenschein, Vierteljahrsh. f. gerichtl. Med. [2] **17**. Heft 2; Chem. Zentralbl. 1873. 423. — A. Jaworowski, Jahresber. f. Tierch. 1892. 192; Kowalewski, Zeitschr. f. analyt. Ch. **24**. 552; Pharmak. Ztg. f. Russland **35**. 83; Chem. Zentralbl. 1896. 1. 770. — Kirk, Glasgow med. Journ. April 1884. 320, nach Lecorché u. Talamon, Traité de l'albuminurie. Paris 1888. 40. — Rosenbach, Deutsche med. Wochenschr. **17**. 1892; Zeitschr. f. analyt. Ch. **32**. 517. — G. Guérin, Journ. de pharm. et de chimie [5] **27**. 362; Zeitschr. f. analyt. Ch. **32**. 635. — A. B. Cohen, Nedrl. Tijdschr. voor Geneesk. 1889. **2**. 561; Jahresber. f. Tierch. 1888. 116. — A. Jolles, Zeitschr. f. analyt. Ch. **29**. 406. 1890.

<sup>2)</sup> R. Altmann, Du Bois' Archiv 1889. 524.

<sup>3)</sup> M. Heidenhain, Pflügers Archiv **90**. 115. 1902, sowie Münch. med. Wochenschr. **49**. 437. 1902.

besitzt das Violettsschwarz der badischen Anilin- und Sodafabrik. (Natriumsalz der p-Phenylendiamin-azo- $\alpha$ -Naphthylamin-azo-1-Naphthol-4-Sulfosäure.) Es liefert noch bei Verdünnungen an Eiweiss von 1:40000 oder 1:60000 flockige Ausscheidungen. Letzterer Farbstoff wird denn auch von Heidenhain zur Harnuntersuchung empfohlen.

Ich möchte auf Grund orientierender eigener Versuche Bedenken für die Verwertbarkeit aussprechen, da auch normale Harn e deutliche Fällungen geben können (Schulz).

#### J. Farbenreaktionen der Eiweissstoffe.

1. Biuretreaktion. Albuminlösung gibt mit schwefelsaurem Kupfer einen bläulich weissen Niederschlag, der sich in Alkalilauge oder kohlensauren Alkalien mit schön violetter Färbung löst (Rose, Piotrowski)<sup>1)</sup>, die Nuance dieser Färbung ist abhängig von der Konzentration der Eiweisslösung und von der Menge des zugesetzten Kupfersalzes. Fügt man zu einer Eiweisslösung zuerst Natronlauge im Überschuss, dann tropfenweise eine verdünnte Kupfervitriollösung und schüttelt nach jedesmaligem Zusatz von Kupfersalz gut um, so wird die Flüssigkeit erst rosa, dann violett, dann immer stärker blau, behält aber bis zuletzt einen deutlichen Stich ins Rote, der namentlich gut hervortritt, wenn man die Flüssigkeit mit einer rein blauen vergleicht. Statt der einzelnen Reagentien lässt sich auch eine alkalische Kupferhydratlösung (Fehlingsche Flüssigkeit) verwenden.

Bei Anstellung der Biuretreaktion soll nicht erwärmt werden, da heisse Natronlauge das Eiweiss bis zum Verschwinden der Biuretreaktion zersetzen kann.

Die Lösung zeigt nach Krukenberg bei Gegenwart von Pepton ein von D 50 E bis F reichendes Absorptionsband. — Enthält die Lösung gleichzeitig gelbe Farbstoffe, so wird das Blau der Biuretfärbung mehr oder minder vollständig ausgelöscht und die Flüssigkeit erscheint dann nur schmutzig rot. Die Reaktion eignet sich schon aus diesem Grunde nicht zur Anstellung im Harn. — Posner<sup>2)</sup> schichtet nach dem Vorschlag Salkowskis auf die alkalisch gemachte Eiweisslösung eine sehr verdünnte (fast farblose) Kupfervitriollösung (z. B. 5 ccm gesättigter Kupfersulfatlösung auf 1 Liter Wasser). — Es gibt Eiweisssubstanzen, bei welchen, wie bei dem Muroid, welches nach der Koagulation von Eiereiweiss in Lösung bleibt, die Biuretfärbung nicht über das Violett hinausgeht. Als Bestandteile des Harns sind solche nicht bekannt.

Eine ammoniakalische Kupfersulfatlösung bleibt nach Gnezda<sup>3)</sup> mit Albumin blau, wird aber mit Albumose violett; die blaue, albuminhaltige Lösung wird auf Zusatz von Kali oder Natron gleichfalls violett, die albumosehaltige rosenrot.

Nickel und Kobalt geben auch eine eigentümliche Biuretfärbung. Die blaue Lösung von Nickelsulfat in Ammoniak wird nach Gnezda mit Albumin blassblau, mit Albumose gelb unter Abscheidung eines flockigen Niederschlags;

<sup>1)</sup> Ferd. Rose, Poggend. Ann. 28. 132. 1833. — Piotrowski, Ber. d. Wiener Akad. 24. 335; Jahresber. f. Ch. 1857. 534.

<sup>2)</sup> C. Fr. W. Krukenberg, Verhandl. d. physik. med. Gesellsch. zu Würzburg, N. F. 18. 202. 1884. — C. Posner, Du Bois' Archiv 1887. 497.

<sup>3)</sup> J. Gnezda, Proceed. of the roy. Soc. 47. 202. 1889; Chem. Zentralbl. 1890. 1. 1030.

auf nachträglichen Zusatz von fixem Alkali wird die Albuminlösung gelb, die Albumoselösung orange, beide unter Bildung eines flockigen Niederschlags (Hofmeister, Schiff). — Eine albuminhaltige Kobaltsulfatlösung färbt sich nach Pickering <sup>1)</sup> mit Ammoniak gelb, mit Kali heliotrop, purpurn und in 30–40 Min. ziegelrot; dieselbe Färbung zeigt eine ammoniakalische Lösung auf Zusatz von Kali, bei Gegenwart von nur wenig Albumin wird sie aber braun. Albumose verhält sich gegen Kobaltsulfat und Ammoniak wie Albumin, wird aber mit dem Sulfat und Kali zunächst rötlich purpurn, in 5–10 Sekunden aber rotbraun.

Die Biuretreaktion gelingt auch mit koaguliertem Eiweiss; man übergiesst solches mit einer sehr verdünnten Kupfervitriollösung, entfernt, wenn das Koagulum mit der Lösung durchtränkt ist, dieselbe wieder und bringt darauf das Gerinnsel in mässig verdünnte Natronlauge; das Koagulum nimmt dabei eine schön veilchenblaue Färbung an (Brücke).

Die praktische Bedeutung der Biuretreaktion ist darin zu sehen, dass ihr Fehlen auch das Fehlen von echtem Eiweiss beweist. Nach E. Fischer gibt es aber hochmolekulare Komplexe, die bei der Spaltung durch Säure Aminosäuren liefern, aber keine Biuretreaktion geben. Das durch Einwirkung von salpetriger Säure auf Eiweiss entstehende Desamidoalbumin, sowie das Jodospongin sind Eiweissstoffe, welche die Biuretreaktion nicht zeigen. Der positive Ausfall ist also nicht absolut spezifisch für Eiweiss. Von den Eiweissspaltungsprodukten geben Histidin und Asparagin die Reaktion. Ausserdem sind noch eine ganze Anzahl stickstoffreicher Stoffe bekannt, die diese Reaktion geben. Schiff <sup>2)</sup> hat die Bedingungen genauer untersucht.

Hofmeister gibt die Intensität der Biuretreaktion für das Eiweiss des Rinderblutserums zu 1:2000 an. Pepton reagiert nach Neumeister <sup>3)</sup> noch in einer Verdünnung 1:10000, Schmidt-Mülheim gibt 1:12000 an.

Ammonsalze in höherer Konzentration setzen die Empfindlichkeit herab (Neumeister). Bei hohem Gehalt der zu prüfenden Flüssigkeit an Ammonsulfat ist es zweckmässig, Kalilauge zu verwenden und zwar so viel, dass ein Überschuss an freiem KOH vorhanden ist. Es krystallisiert dann Kaliumsulfat aus. Die Biuretfarbe lässt sich nach dem Absitzen der Krystalle in der überstehenden Schicht beobachten.

**2. Xanthoproteinreaktion.** Versetzt man wenig einer Albuminlösung mit konzentrierter Salpetersäure und erwärmt, gleichgültig, ob der entstandene Niederschlag wieder in Lösung gegangen war oder nicht, so färbt sich die Flüssigkeit unter teilweiser oder gänzlicher Lösung des vorhandenen Niederschlags zitronengelb; die Albumosen und das Pepton erleiden diese Gelbfärbung schon in der Kälte; übersättigt man die Flüssigkeit mit einem Alkalihydrat, so nimmt sie eine intensiver gelbe oder ins Bräunliche spielende Färbung an. Auch gefälltes Eiweiss gibt diese Reaktion. — Ammoniak ist nur dann für die Übersättigung geeignet, wenn es für sich mit konzentrierter Salpetersäure farblos bleibt.

Die Xanthoproteinreaktion ist von Fourcroy und Vauquellin entdeckt; sie beruht auf der Nitrierung aromatischer Komplexe und zwar in erster Linie auf einer Nitrierung der Oxyphenylgruppe (tyrosinliefernder Komplex), in zweiter Linie auf einer Nitrierung der Indolgruppe (Salkowski, v. Fürth, Rohde <sup>4)</sup>).

<sup>1)</sup> F. Hofmeister, Zeitschr. f. physiol. Ch. **2**. 288. 1878. — H. Schiff Ber. d. chem. Gesellsch. **29**. 298. 1896. — J. W. Pickering, Journ. of Physiol. **14**. 354. 1893.

<sup>2)</sup> H. Schiff, l. c. sowie Liebigs Ann. **299**. 236. 1897 u. **319**. 302. 1901.

<sup>3)</sup> F. Hofmeister, l. c. — R. Neumeister, Zeitschr. f. Biol. **26**. 324. 1889.

<sup>4)</sup> Fourcroy u. Vauquellin, Annales de chim. **56**. 36. 1805. — E. Salkowski, Zeitschr. f. physiol. Ch. **12**. 125. 1888. — O. v. Fürth, Einwirkung von Salpetersäure auf Eiweissstoffe. Habilit.-Schrift Strassburg 1899. — E. Rohde, Zeitschr. f. physiol. Ch. **44**. 161. 1905, auch Diss. Heidelberg 1905.



Die Xanthoproteinreaktion ist nicht auf die Eiweissstoffe beschränkt, sondern erstreckt sich auf zahlreiche in Tier- und Pflanzenreich vorkommende Substanzen (z. B. Huminsubstanzen, Eiweisspaltungsprodukte etc.). Die Reaktion ist daher im Harn direkt nicht anwendbar.

3. Millonsche Reaktion. Man setzt zu einer Eiweisslösung reichlich eine Lösung von salpetersaurem Quecksilberoxyd und erhitzt zum Kochen. Der Flüssigkeit wird dann abermals reichlich eine Lösung von salpetrigsaurem Kali hinzugefügt. Häufig färben sich schon jetzt Flüssigkeit und Niederschlag rot, sicher tritt aber die Färbung ein, wenn die Mischung abermals gekocht wird. Der Niederschlag ist meist dunkler rot gefärbt, als die Lösung, oft auch der Niederschlag allein gefärbt. Die Reaktion gelingt auch mit Eiweissniederschlägen. Bei Gegenwart von viel Chloriden kann sie nach Salkowski<sup>1)</sup> ganz ausbleiben; auch Alkohol und Wasserstoffsuperoxyd hemmen die Reaktion. Selbstverständlich lässt sich die Reaktion auch mit dem fertigen Millonschen Reagens (S. auch bei Phenol) anstellen.

Käufliches salpetrigsaures Kali gibt oft wegen seines Gehaltes an kohlensaurem Salz mit der Flüssigkeit einen Niederschlag, welcher die Reinheit der Reaktion in erheblicher Weise stört; die Kohlensäure lässt sich am einfachsten durch Zusatz von Salpetersäure aus dem Nitrit entfernen.

Ein grösserer Überschuss von  $\text{HNO}_3$  ist zu vermeiden, da sonst nur die Gelbfärbung der Xanthoproteinsäurereaktion zum Vorschein kommt. Bei Verwendung des Millonschen Reagens ist es zweckmässig, das Reagens nach dem Auflösen des Hg mit Alkalilauge bis zur schwach sauren Reaktion abzustumpfen.

O. Nasse<sup>2)</sup> empfiehlt statt des Millonschen Reagens eine wässrige Lösung von Quecksilberacetat, die vor dem Gebrauch mit einigen Tropfen einer 1 %igen Lösung von Kalium- oder Natriumnitrit versetzt wird.

Die Millonsche Reaktion ist eine Gruppenreaktion auf hydroxylierte Benzolderivate. Sowohl die Benzolderivate mit einer Hydroxylgruppe, als auch solche mit zwei Hydroxylgruppen (z. B. Brenzcatechin) geben die Millonsche Probe. Die Reaktion ist negativ bei solchen Benzolderivaten, bei welchen die beiden in Orthostellung zur Hydroxylgruppe befindlichen H-Atome oder die beiden in Metastellung befindlichen substituiert sind (Blum und Vaubel, Lintner<sup>3)</sup>).

Tryptophan gibt eine braunrote Färbung (Abderhalden u. Kempe<sup>4)</sup>).

4. Die Schwefelbleireaktion. Erwärmt man Eiweiss oder Eiweisslösungen mit starker Natron- oder Kalilauge, nachdem man ein Bleisalz (Bleiacetat) hinzugefügt hat, so tritt nach einiger Zeit eine braune bis schwarze Färbung ein. Bei längerem Erwärmen kann sich ein schwarzer Niederschlag abscheiden. Es handelt sich bei dieser Reaktion darum, dass ein Teil des Schwefels der Eiweissstoffe als Schwefelwasserstoff abgespalten wird, was unter den gewählten Bedingungen zur Bildung von schwarzem Bleisulfid führt.

5. Furfurolreaktionen. Reine Eiweisskörper, auch das Pepton, dagegen nicht das Casein und der Leim, liefern nach von Udránszky bei der Destillation mit Schwefelsäure eine Flüssigkeit, in welcher sich durch besondere Reaktionen Furfurol nachweisen lässt. Auch andere Säuren sind zur Bildung von Furfurol geeignet;

<sup>1)</sup> E. Salkowski, Virchows Archiv 81. 552. 1880.

<sup>2)</sup> O. Nasse, Pflügers Archiv 83. 361. 1901.

<sup>3)</sup> F. Blum u. W. Vaubel, Journal f. prakt. Ch. 56. 393. Ebenda 57. 365. 1897. — W. Vaubel, Zeitschr. f. angew. Ch. 1900. 1125. — C. J. Lintner, ebenda 1900. 707.

<sup>4)</sup> Abderhalden u. Kempe, Zeitschr. f. physiol. Ch. 52. 207. 1907.



die Ausbeute ist nach Günther, de Chalmot und Tollens<sup>1)</sup> gering. Der bei der Spaltung der Eiweissstoffe entstehende Zucker ist als Ursache diese Furfurolbildung anzusprechen. Für den Nachweis des Furfurols hat man nicht nötig, es abzudestillieren. Das Eiweiss selbst bildet mit Furfurol farbige Verbindungen und man kann diese entweder mit dem aus Eiweiss selbst, oder aus einer anderen Substanz (Zucker) erzeugten Furfurol herstellen.

a) Reaktionen von Molisch. Seegen<sup>2)</sup> hat gezeigt, dass die von Molisch zum Nachweis von Zucker angegebenen Furfurolreaktionen auch auf (zuckerfreie) Eiweisskörper anwendbar sind, soweit dieselben Zuckerkomplexe in ihrem Molekül enthalten. Casein, welches keinen Zucker im Molekül enthält, gibt die Reaktion nicht.

Versetzt man nach Molisch<sup>3)</sup> 0,5—1 ccm einer Eiweisslösung mit zwei Tropfen einer 15—20 %igen alkoholischen  $\alpha$ -Naphthollösung, darauf mit dem vierfachen Volumen konzentrierter Schwefelsäure und schüttelt um, so erhält man (auch vom Pepton) eine granat- oder rubinrote bis violette Lösung. Verdünnt man die Flüssigkeit mit Wasser, so entstehen violette (bei Fibrin braune) Niederschläge, die sich in konzentrierter Salzsäure zumeist mit schön violetter Farbe lösen.

Verwendet man statt der  $\alpha$ -Naphthollösung eine ebenso starke alkoholische Thymollösung, so erhält man rote Lösungen, welche bei den meisten Eiweisskörpern durch Verdünnen schmutzig gelbliche oder gelbbraune Niederschläge, beim Pepton aber einen roten Niederschlag geben. Alle diese Niederschläge lösen sich in konzentrierter Salzsäure mit carminroter oder rotvioletter Farbe.

b) Reaktion von Max Schultze. Wenn man einer Lösung von Eiweiss in mässig konzentrierter Schwefelsäure einige Tropfen einer verdünnten Rohrzuckerlösung hinzufügt und die Flüssigkeit auf 60° erwärmt, so färbt sie sich schön bläulich rot. Das Einhalten der Temperatur von 60° ist für das Gelingen der Reaktion von wesentlicher Bedeutung.

6. Tryptophanreaktionen. a) Reaktion von Adamkiewicz. Eine Lösung von Eiweiss in Eisessig nimmt auf Zusatz von konzentrierter Schwefelsäure eine schön violette Färbung und schwache grünliche Fluoreszenz an; bei geeigneter Konzentration zeigen die Lösungen im Spektrum einen Absorptionsstreifen zwischen b und F, wie das Urobilin, welchem nach Krukenberg<sup>4)</sup> ein Streifen zwischen D und E vorhergeht. Die Probe gelingt nach Krukenberg mit allen Eiweisskörpern, auch mit Pepton, dagegen mit Leim und seinen Abkömmlingen nicht.

Man kann die Probe so anstellen, dass man die Lösung in Essigsäure der konzentrierten Schwefelsäure hinzufügt, oder dass man der Mischung beider Säuren die Eiweisslösung tropfenweise zusetzt. Hammarsten erhitzt eine kleine Menge der Eiweisslösung oder der festen Substanz in einem Gemisch von 1 Vol. konzentrierter Schwefelsäure und 2 Vol. Eisessig zum Sieden, wobei die violette Farbe besser als bei Zimmertemperatur hervortritt. Nach Wurster gelingt die Reaktion am sichersten und schönsten, wenn man der Probe einige Körnchen Kochsalz hinzufügt. Schichtet man nach Posner die Lösung des Eiweisses in Eisessig auf die

<sup>1)</sup> L. v. Udránsky, Zeitschr. f. physiol. Ch. 12. 392. 1888. — A. Günther, G. de Chalmot u. B. Tollens, Ber. d. chem. Gesellsch. 25. 2569. 1892.

<sup>2)</sup> Seegen, Zentralbl. f. d. med. Wissensch. 1886. 802.

<sup>3)</sup> H. Molisch, Monatshefte f. Chemie. 7. 198; Zentralbl. f. d. med. Wissensch. 1887. 49.

<sup>4)</sup> Adamkiewicz, Pflügers Archiv 9. 156. 1874; Ber. d. chem. Gesellsch. 8. 161. 1875; Zentralbl. f. d. med. Wissensch. 1875. 856; Arch. f. exper. Pathol. 3. 423; Zeitschr. f. analyt. Ch. 15. 467. — Krukenberg, Chemische Untersuchungen 1. 100. 1886.

konzentrierte Schwefelsäure, so entsteht an der Berührungsstelle beider Flüssigkeiten ein violetter Ring von stärkerer Färbung, als wenn man mischt. Der dabei entstehende urobilinähnliche Farbstoff lässt sich nach Michailow<sup>1)</sup> aus der Lösung durch Sättigen mit Ammonsulfat, neben Eiweiss, abscheiden und dem Niederschlag durch Alkohol entziehen.

v. Udránsky deutete auch diese Reaktion als Furfurolreaktion. Auch Hofmeister<sup>2)</sup> akzeptierte zunächst diese Meinung und erklärte demnach die Reaktion so, dass er sie als analog der Reaktion von Molisch auffasste, nur mit dem Unterschied, dass hier nicht nur das furfurolliefernde Kohlehydrat, sondern auch der aromatische Komplex aus dem Eiweiss stamme.

Hopkins und Cole<sup>3)</sup> haben jedoch gezeigt, dass es sich gar nicht um eine Furfurolreaktion handelt, sondern dass die Reaktion darauf beruht, dass der gewöhnliche zu dieser Reaktion verwandte Eisessig Glyoxylsäure ( $\text{HO} \cdot \text{COOH}$ ) als Verunreinigung enthält. Durch Destillation kann die Glyoxylsäure entfernt werden und dann geht die Reaktion nicht mehr.

Man stellt die Reaktion daher zweckmässig nicht mehr wie oben angegeben an, sondern versetzt die Eiweisslösung mit verdünnter Glyoxylsäurelösung und schichtet diese Mischung auf konzentrierte Schwefelsäure auf. Hopkins und Cole zeigten ferner, dass die zweite Komponente bei dieser Reaktion in der Tryptophan liefernden Gruppe zu suchen ist. — Die Glyoxylsäurelösung stellt man sich her, indem man zu starker Oxalsäure etwas Natriumamalgam hinzugibt und nach beendigter Gasentwicklung filtriert.

b) *a. Reaction von Acrée*<sup>4)</sup> mit Formaldehyd. Man setzt zu dem Eiweisskörper eine geringe Portion Formaldehydlösung 1:5000. Unterschichtet man nun mit konzentrierter Schwefelsäure, so entsteht eine violette Zone.

*β. Die Reaktion von Voisin*<sup>5)</sup>. Setzt man zu einem in Wasser gelösten oder suspendierten Eiweissstoff etwas salpetrige Säure enthaltende Salzsäure oder Schwefelsäure bei Gegenwart von Formaldehydspuren, so färbt sich die Flüssigkeit je nach der reagierenden Formaldehydmenge schwach violettrosa bis dunkelviolettblau. Man verwendet konzentrierte Salzsäure, der pro Liter  $\frac{1}{2}$  bis  $\frac{1}{4}$  ccm 3,6%iger Kaliumnitritlösung zugesetzt werden. Zu 2—3 ccm Eiweisslösung setzt man 1 Tropfen 5%iger Formollösung und verdünnt dann die Flüssigkeit mit dem dreifachen Volumen der nitrihaltigen Salzsäure. Erwärmen auf 50° begünstigt die Reaktion. Die Reaktion ist ebenfalls auf die Indolgruppe zurückzuführen. Die Reaktion ist sehr scharf.

c) Reaktion von Liebermann. Die bekannte Violettblaufärbung, welche Eiweiss beim Erhitzen mit Salzsäure erleidet, tritt am schönsten ein, wenn man die Probe erst durch wiederholtes Auskochen mit Alkohol, dann durch wiederholte Extraktion mit Äther entfettet und darauf mit konzentrierter, am besten rauchender Salzsäure erhitzt oder mit der heissen Säure auf einer weissen Unterlage übergiesst. Statt der Salzsäure verwendet man nach Wurster besser eine

<sup>1)</sup> O. Hammarsten, Pflügers Archiv **36**. 389. 1885. — C. Wurster, Zentralbl. f. Physiol. 1887. 193. — C. Posner, Virchows Archiv **104**. 503. 1886. — W. Michailow, Berichte d. chem. Gesellsch. **17**. Ref. 255. 1884.

<sup>2)</sup> Hofmeister, Zeitschr. f. physiol. Ch. **24**. 159. 1897. — L. v. Udránsky, ebenda **12**. 355 und **13**. 248.

<sup>3)</sup> F. G. Hopkins und Sydney W. Cole, Proceed. of the royal Soc. **68**. 21. 1901, sowie Journ. of Physiol. **27**. 418. 1901. — W. Cole, Journ. of Physiol. **30**. 311. 1904.

<sup>4)</sup> Acrée, Americ. chem. Journ. **37**. 604. 1907. Chem. Zentralbl. 1907. II. 429.

<sup>5)</sup> E. Voisin, Bullet. Soc. Chim. de Paris. (3) **33**. 1198. 1905.

Mischung von gewöhnlicher Salzsäure mit  $\frac{1}{10}$ — $\frac{1}{3}$  Vol. konzentrierter Schwefelsäure. Nach Krukenberg<sup>1)</sup> weist die Flüssigkeit einen breiten auf E und b und nach beiden Seiten darüber hinausliegenden Absorptionsstreifen auf.

Die Reaktion gelingt nach Liebermann mit den meisten Eiweisskörpern, jedoch nicht mit dem Chondrin, Keratin, ferner nach le Nobel nicht mit dem in gesättigter Ammonsulfatlösung löslichen Pepton. Die Probe versagte Liebermann mit dem mucinartigen Körper des Pferdeharns, nach Posner<sup>2)</sup> deshalb, weil zu wenig Harn zu dem Versuch verwandt wurde. Hämoglobin ist für die Reaktion nicht geeignet.

Auch diese Reaktion ist zunächst als Furfuroreaktion gedeutet worden (Hofmeister). Es ist jedoch neuerdings wahrscheinlich gemacht, dass auch hier das Tryptophan in Reaktion tritt (Cole, Abderhalden und Kempe<sup>3)</sup>) und zwar analog wie bei der Reaktion von Adamkiewicz mit Glyoxylsäure, welche den Äther verunreinigt (Cole). — Dagegen ist allerdings zu bemerken, dass bei genügend langem Erwärmen mit konzentriertem HCl auch Eiweiss, das nicht mit Äther in Berührung war, die Violettfärbung zeigt.

Auch bei Verwendung von Schwefelsäure kommt eine Violettfärbung zustande (Elliot<sup>4)</sup>).

#### d) Reaktionen mit aromatischen Aldehyden.

$\alpha$ ) Reaktion von Neubauer und Rhode<sup>5)</sup>. Versetzt man eine Eiweissauflösung oder auch aufgeschwämmtes Eiweiss mit 5—10 Tropfen einer 5%igen Lösung von p-Dimethylaminobenzaldehyd in 10%iger Schwefelsäure und lässt dann unter Umschütteln konzentrierte Schwefelsäure zufließen, so tritt eine rotviolette Färbung auf, die allmählich dunkelviolet wird. Spektroskopisch findet man einen breiten verwaschenen Streifen in Orange und einen zweiten undeutlichen in Grün. Von den bekannten Eiweisspaltungsprodukten gibt nur das Tryptophan die Reaktion.

Steensma<sup>6)</sup> benutzt als Reagentien 1. ein 2%ige Lösung von p-Dimethylaminobenzaldehyd in 96%igem Alkohol und 2. eine 0,5%ige Lösung von Natriumnitrit in Wasser. Man kocht das Eiweiss bzw. die Eiweisslösung mit einer Salzsäure von 25% und einer genügenden Menge des Reagens I. Die Flüssigkeit nimmt eine rote Farbe an (wie bei der oben beschriebenen Reaktion). Jetzt fügt man einige Tropfen der Natriumnitritlösung hinzu und bekommt dann eine intensiv blaue Farbe. Der blaue Farbstoff geht nicht in Chloroform über. Die Reaktion fällt mit Salzsäure schöner aus wie bei Verwendung von Schwefelsäure (Rhode). Eine Verwechselung mit der Liebermannschen Reaktion ist durch das Hinzufügen der Nitritlösung ausgeschlossen.

$\beta$ ) Reaktion mit Vanillin von Steensma. Die Reagentien bestehen aus einer 5%igen Lösung von Vanillin in Alkohol (96%) und einer Lösung von Natriumnitrit in Wasser (0,5%). Die Reaktion wird in gleicher Weise wie beim p-Dimethylaminobenzaldehyd beschrieben ausgeführt. Die Farbe ohne Hinzufügen von Nitrit ist rot (Rhode), nach Hinzufügen der Nitritlösung blau (Steensma).

<sup>1)</sup> L. Liebermann, Zentralbl. f. d. med. Wissensch. 1887. 321 u. 450. — Krukenberg, Verhandl. d. physik. med. Gesellsch. zu Würzburg N. F. 18. 201. 1884.

<sup>2)</sup> le Nobel, Zentralbl. f. d. med. Wissensch. 1887. 625. — Posner, Zentralbl. f. d. med. Wissensch. 1887. 420.

<sup>3)</sup> Hofmeister, Leitfaden für d. prakt. chem. Unterricht d. Mediziner. 1899 (Verlag Vieweg). — Sydney W. Cole, Journ. of physiol. 30. 311. 1904. — E. Abderhalden u. M. Kempe, Zeitschr. f. physiol. Ch. 52. 207. 1907.

<sup>4)</sup> J. H. Elliot, Journ. of physiol. 23. 296. 1898.

<sup>5)</sup> O. Neubauer, Sitzungsber. d. Gesellsch. f. Morphol. u. Physiol. München 1903. 32. — Verhandl. d. Gesellsch. d. Naturf. u. Ärzte 1903. 68. — E. Rhode, Zeitschr. f. physiol. Ch. 44. 161. 1905.

<sup>6)</sup> F. A. Steensma, Zeitschr. f. physiol. Ch. 47. 25. 1906.



γ) Reaktion mit p-Nitrobenzaldehyd. Eiweiss mit p-Nitrobenzaldehyd in Substanz und Salzsäure gekocht gibt eine grüne Farbe (Rhode). Diese Farbe geht nach Hinzufügen von Natriumnitritlösung in ein schönes dunkles Blau über (Steensma).

δ) Reaktion mit Benzaldehyd nach Reichl<sup>1)</sup>. Eiweiss gibt mit 2—3 Tropfen alkoholischer Benzaldehydlösung und gleichem Volum verdünnter Schwefelsäure oder konzentrierter Salzsäure und 1 Tropfen Ferrisulfatlösung oder einer anderen oxydierenden Substanz dunkelblaue Färbung. Die Schwefelsäure lässt sich auch durch konzentrierte Salzsäure, das Ferrisulfat durch Eisenchlorid, Salpetersäure, Quecksilberoxyd und andere oxydierende Substanzen ersetzen. Der blaue Körper ist in Wasser und Säuren löslich und zeigt einen Absorptionsstreifen bei D. Alkalihydrate geben mit der Lösung einen braunen Niederschlag, der sich nach dem Auswaschen in Säuren wieder mit blauer Farbe löst. Die Reaktion wird nur noch mit 6%igen Eiweisslösungen erhalten. Die Reaktion ist bis jetzt nur mit Eier- und Serumeiweiss, Casein, Fibrin, Wolle und pflanzlichen Eiweisskörpern angestellt worden. — Auch viele andere Aldehyde gehen die Reaktion ein; Salicylaldehyd färbt blau bis violett, Piperonal veilchenblau, Vanillin rot, violett, veilchenblau, Anisaldehyd violett und blau. Da Indol und Skatol mit Benzaldehyd blaue und braune Kondensationsprodukte geben, so scheint diese Gruppe im Eiweiss die Reaktion zu bewirken.

7. Diazoreaktion nach Petri<sup>2)</sup>. Versetzt man eine Eiweiss- oder Albumosenlösung mit Diazobenzolsulfosäure, so tritt nur eine schwache Gelbfärbung ein; macht man die Mischung aber mit fixem Alkali alkalisch, so wird die Flüssigkeit, je nach ihrer Konzentration, orangegelb bis braunrot und gibt einen roten Schüttelschaum.

Die Lösung absorbiert das Licht vom violetten Ende, je nach der Konzentration, bis in das Rot. Ammoniak gibt gleichfalls eine intensive, aber nur gelbe Färbung ohne Beimischung von Rot.

Versetzt man eine solche gelbrote Flüssigkeit mit Zinkstaub oder Natriumamalgam, so wird sie, bei gleichzeitigem Luftzutritt, schön fuchsinrot. Bei geeigneter Verdünnung zeigt sie dann zwei Absorptionsstreifen, einen von D bis F und einen zweiten von G bis zum violetten Ende reichenden. Beim Neutralisieren wird die fuchsinrote Lösung gelb, beim Übersättigen mit einer Mineralsäure wieder rot, aber in anderer Nuance als vorher, und weist dann eine von D beginnende Absorption, ohne Aufhellung im blauen Teil, auf. Organische Säuren rufen dieses Rot nicht hervor. Ammoniak färbt die Flüssigkeit bloss gelb, fixes Alkali im Überschuss dagegen wieder fuchsinrot. Bei der Reduktion unter Abschluss der Luft entsteht eine gelbliche Flüssigkeit, die bei Luftzutritt fuchsinrot wird. — Traubenzucker gibt nach Petri ganz dieselben Farbenscheinungen (S. 382).

8. Eine Eiweisslösung färbt sich wie das Tyrosin (s. dort) beim Erwärmen mit etwas trockenem Chinon nach Wurster<sup>3)</sup> tiefrubinrot; nach längerem Stehen wird die Flüssigkeit braun.

Mit den verschiedensten Chinonen lassen sich ähnliche Farbenreaktionen erzielen (Raciborski)<sup>4)</sup>.

9. Bei aufeinander folgender Behandlung von (festem) Eiweiss mit salpetriger Säure und alkalischen Lösungen von Phenolen (Phenol, Resorcin, Pyrogallol, α- und β-Naphthol) färbt es sich nach Obermayer<sup>5)</sup> intensiv, meist rot oder braun. Die Reaktion beruht, wie die ähnliche des Tyrosins (s. dort), auf der Bildung einer Diazoverbindung.

<sup>1)</sup> Reichl, Monatsh. f. Ch. 10. 317. 1889 u. 11. 155. 1890.

<sup>2)</sup> Petri, Zeitschr. f. physiol. Ch. 8. 294. 1884.

<sup>3)</sup> Wurster, Zentrabl. f. Physiol. 1887. 195.

<sup>4)</sup> M. Raciborski, Anzeig. d. Akad. d. Wissensch. in Krakau 1906. 553.

<sup>5)</sup> F. Obermayer, Ber. d. chem. Gesellsch. 27. Rf. 354. 1894.



10. Reaktion von Fröhde<sup>1)</sup>. Beim Behandeln von festem Albumin mit molybdänsäurehaltiger Schwefelsäure färbt es sich schön dunkelblau.

11. Versetzt man nach Michailow<sup>2)</sup> Eiweiss oder einen noch Stickstoff und Schwefel enthaltenden Abkömmling desselben mit Eisenvitriol, schichtet die Mischung auf konzentrierte Schwefelsäure und fügt vorsichtig sehr wenig Salpetersäure hinzu, so treten ausser dem braunen Ringe des Stickoxyd-Eisenoxydulsalzes noch Ringe von blutroter Farbe (Rhodaneisen?) auf. Eine schwache Rosafärbung zeigt sich auch allein beim Zusammenbringen der Reagentien.

12. Säuert man nach Axenfeld Eiweisslösung mit Ameisensäure an, fügt 0,1 %ige Goldchloridlösung tropfenweise hinzu und erwärmt, so färbt sich die Lösung erst rosenrot, darauf purpurrot, dann nach weiterem Zusatz von Goldchlorid blau und endlich tritt ein blauer flockiger Niederschlag ein. Albumosen werden nach Pickering<sup>3)</sup> nur rötlich violett. Für Eiweiss charakteristisch ist nur die Rotfärbung; blau und violett wird die Probe auch durch viele andere Körper, wie Traubenzucker, Glykogen, Stärkemehl, Leucin, Tyrosin, Harnsäure, Harnstoff, Kreatinin etc. Reiner Leim gibt eine dichroitische braune und rötliche Färbung, Guanin eine schön purpurrote, die jedoch, zum Unterschied vom Eiweiss, durch fixes Alkali in Orange gelb übergeht. — Die Probe ist sehr empfindlich, Kochsalz, Harnstoff, Harnsäure, Traubenzucker hindern nur in grossen Mengen und es bedarf dann zur Hervorrufung der Eiweissreaktion eines stärkeren Zusatzes von Ameisensäure und Goldchlorid.

Die Farbenreaktionen können vielfach auch mit Eiweissniederschlägen, sowie mit dem Ferrocyanwasserstoff- (Winternitz)<sup>4)</sup>, dem Phosphorwolframsäureniederschlag etc. erhalten werden.

## Allgemeines über Vorkommen von Eiweiss im Harn.

Man kann drei Arten der Eiweissausscheidung durch den Harn unterscheiden.

I. Der normale Eiweissgehalt eines jeden Harns, der sich nicht durch die gewöhnlichen Eiweissproben (z. B. Kochprobe, Hellersche Probe, Essigsäure-Ferrocyankaliumprobe), sondern unter Anwendung bestimmter Methoden (s. später) nachweisen lässt. Mit seinem Reagens (s. später) hat Spiegler bei Gesunden ausserordentlich oft geringe Spuren Eiweiss im Harn angetroffen.

II. Die physiologische Albuminurie, eine durch bestimmte, zu besprechende Momente hervorgerufene Steigerung des normalen Eiweissgehaltes, bis zur Grenze der direkten Nachweisbarkeit durch die gewöhnlichen Eiweissreaktionen. Für die physiologische Albuminurie ist es charakteristisch, dass keine Organschädigungen, Nephritis etc., zugrunde liegen.

<sup>1)</sup> Fröhde, Zeitschr. f. analyt. Ch. 7. 266.

<sup>2)</sup> W. Michailow, Ber. d. chem. Gesellsch. 17. Ref. 450.

<sup>3)</sup> D. Axenfeld, Zentralbl. f. d. med. Wissensch. 1885. 209. — J. W. Pickering, Journ. of Physiol. 14. 376. 1893.

<sup>4)</sup> H. Winternitz, Zeitschr. f. physiol. Ch. 16. 439. 1892.

III. Die pathologische Albuminurie als Folgezustand krankhafter Beeinflussung der bei der Harnsekretion in Betracht kommenden Faktoren (Albuminurie im alten, engeren Sinne des Wortes).

Unter pathologischen Verhältnissen können von Eiweisskörpern im Harn auftreten: Serumalbumin, Serum- (oder Para-) globulin, Albumosen, Pepton, Hämoglobin, Methämoglobin, Fibrin, wahrscheinlich auch Fibrinogen. Es kommt entweder der eine oder der andere für sich allein vor, oder es finden sich mehrere nebeneinander (Albumin oder Globulin, Albumin, Globulin und Hämoglobin).

#### I. Der normale Eiweissgehalt des Harns.

Dass in jedem Harn sich Spuren von Eiweiss nachweisen lassen, ist unzweifelhaft. Man kann vielleicht zweierlei verschiedene Eiweissarten von vornherein annehmen. Eine mucinartige oder nuclealbuminartige Eiweisssubstanz, die nach früher Gesagtem zu den Proteiden zu rechnen wäre und einen gewöhnlichen Eiweissstoff albumin- oder globulinartiger Natur. Man ist geneigt, diesen beiden Eiweissarten verschiedene Bedeutung beizumessen. Die mucinartige (nuclealbuminartige) Substanz soll ein Sekret der die Harnwege auskleidenden Schleimhäute sein, während das echte Eiweiss bei dem eigentlichen Sekretionsvorgang des Harns in den Nieren in den Harn gelangt.

a) Die Nubekula. Lässt man Harn stehen, so scheidet sich nach einiger Zeit eine mehr oder weniger starke, wolkige Trübung aus, die man als Nubekula bezeichnet. Durch schwaches Ansäuern des Harns mit Essigsäure kann ebenfalls eine Fällung einer eiweissartigen Substanz hervorgerufen werden. Die Fällbarkeit durch Essigsäure ist eine Eigenschaft vieler Proteide (z. B. Mucin, Nuclealbumin). Man war daher zunächst geneigt, im Harn vorgebildete Proteide ohne weiteres für diese Fällungen verantwortlich zu machen (Näheres siehe bei Harnmucoid und bei Nuclealbumin des Harns).

Wie misslich es ist, auf Grund einfacher Löslichkeitsverhältnisse Eiweissstoffe zu charakterisieren, zumal wenn sie in unreinem Zustand und in komplizierten Salzlösungen zur Untersuchung gelangen, ist jedem, der sich mit Eiweissstoffen beschäftigt hat, bekannt. Es sind daher gerade bei den Harneiweissstoffen vielfach Irrtümer unterlaufen. Schlagend hat das Mö r n e r<sup>1)</sup> dargetan. Er zeigte, dass im Harn eiweissfällende Substanzen vorkommen, die sich beim Ansäuern mit Essigsäure mit gewöhnlichem Eiweiss zu unlöslichen Stoffen vereinigen. Hierher

<sup>1)</sup> K. A. H. Mö r n e r, Skandinav. Arch. f. Physiol. 6. 403. 1895.

gehört vor allem die Chondroitinschwefelsäure und die Nucleinsäure sowie unter manchen Bedingungen die Gallensäuren. Es lässt sich nach Mö r n e r unter geeigneten Versuchsbedingungen (s. später) aus jedem Harn durch Essigsäure ein Eiweissniederschlag gewinnen, der aber nicht als Mucin oder Nucleoalbumin aufzufassen ist, sondern sekundär durch Paarung einer eiweissfällenden Substanz mit primär vorhandenem gewöhnlichem Eiweiss entstanden ist. Es ist daher ersichtlich, dass man mit der Annahme einer mucin- oder nucleoalbuminartigen Substanz im Harn sehr vorsichtig sein muss. Die Menge des in dem vermeintlich eiweissfreien Harn vorkommenden Eiweisses lässt sich nach Mö r n e r s Bestimmungen auf 36 mg (22—78 mg) im Liter schätzen. Der Harn enthält aber an eiweissfällenden Säuren soviel, dass sie gut die doppelte Menge Eiweiss niederschlagen können, wie das in der Tat geschieht, wenn bei sonst gesunden Personen (Kindern, jungen Männern) noch unter physiologischen Verhältnissen Eiweiss in grösserer Menge ausgeschieden wird (transitorische Albuminurie).

b) Methoden zum Nachweis des normalen Eiweissgehaltes des Harns.

1. Methoden von Posner. a) Harn wird mit einer mindestens dreifachen Menge Alkohol oder auch mit konzentrierter Tanninlösung versetzt. Der entstandene Niederschlag wird mit Wasser ausgewaschen und durch Essigsäure gelöst. — b) Harn wird mit Essigsäure versetzt und durch Eindampfen konzentriert. — In beiden Fällen werden dann mit der essigsäuren Lösung Eiweissreaktionen angestellt. Posner fand bei 70 Gesunden (Erwachsenen und Kindern) auf diese Weise Eiweiss. Nachprüfungen durch Senator, Duden, v. Noorden, Leube, Simader<sup>1)</sup> führten zu dem gleichen Ergebnis, vorausgesetzt, dass genügend grosse Harnmengen zur Untersuchung gelangen. Bei kleineren Harnmengen ist der Befund manchmal negativ.

2. Methode von Plosz<sup>2)</sup>. Filtrierter Harn wird mit Essigsäure stark angesäuert und mit Äther oder Chloroform oder Amylalkohol geschüttelt. Es scheiden sich dabei Gerinnsel ab, deren Eiweissnatur durch geeignete Reaktion dargetan werden kann.

3. Die Methode von K. A. H. Mö r n e r<sup>3)</sup>. Von der Ansicht ausgehend, dass es im wesentlichen die dialysablen Harnbestandteile sind,

<sup>1)</sup> C. Posner, Berl. klin. Wochenschr. 1885. Nr. 41, sowie Virchows Archiv 104. 497. 1886. — H. Senator, Die Albuminurie, 2. Aufl. 427. — Duden, Zentralbl. f. d. med. Wissensch. 1887. 238. — C. v. Noorden, Berl. klin. Wochenschr. 1886. 166 sowie 1890. 215. — W. Leube, Zeitschr. f. klin. Med. 13. 1. 1888. — P. Simader, Zeitschr. f. Tiermediz. N. F. 1. 404. 1897.

<sup>2)</sup> P. Plosz, Orvosi Hetilap. 1890. 504; Jahresber. f. Tierch. 20. 215. 1890.

<sup>3)</sup> K. A. H. Mö r n e r l. c.



welche eine Fällung der Harn eiweissstoffe durch Säure, bezw. mit Chloroform etc. erschweren, wird der Harn zunächst einer ausgiebigen Dialyse unterworfen. Harn, mit Chloroform oder Thymol versetzt, wird 24 Stunden gegen fliessendes Leitungswasser dialysiert. Der dialysierte Harn wird dann mit 0,1–0,2 Prozent Essigsäure versetzt und mit einem Überschuss von Chloroform geschüttelt. Es ist zweckmässig, das Schütteln ohne Wechseln des Chloroforms häufiger zu wiederholen. Nach längerer oder kürzerer Zeit hat sich ein Niederschlag abgesetzt, der teilweise in der trüben Chloroformschicht, teilweise in einer Grenzschicht zwischen Chloroform und Harn sich befindet, der überstehende Harn ist völlig klar. Die Abscheidung ist meist erst nach mehreren Tagen so vollständig, dass der Harn völlig klar wird. Der Niederschlag wird auf einem Filter gesammelt, indem man die trüben Schichten filtriert.

Der Niederschlag wird in Wasser, das schwach ammoniakalisch ist, gelöst und dann durch Essigsäure (wenn nötig unter Schütteln mit Chloroform) nochmals gefällt. Zur weiteren Prüfung wird eine schwach ammoniakalische Lösung dieses Niederschlages benutzt. Nach Mörner gibt diese Lösung die Reaktion von Millon, Adamkiewicz, die Biuretprobe, die Hellersche Probe, ferner Fällung mit Metaphosphorsäure, Sulfosalicylsäure, Trichloressigsäure, Pikrinsäure + Zitronensäure (Esbachsches Reagens) und Gerbsäure.

Mörner fand stets Eiweiss auf diese Weise in Harnen, die keine Hellersche Probe gaben.

4. Verfahren nach Ott<sup>1)</sup>. Man versetzt Harn mit dem gleichen Volum konzentrierter Kochsalzlösung und dann mit Almenscher Lösung, es entsteht dabei ein Niederschlag, der beträchtlicher ist, wie der durch Essigsäure erzeugbare. Nach Ott soll der entstehende Niederschlag ein Nucleoalbumin sein. Nach den Untersuchungen Mörners ist es aber wahrscheinlich, dass es sich um die Wirkung „eiweissfällender Substanzen“ handelt.

Almensche Lösung. 4,0 g Acid. tannic. purum, 8 cem 25 %iger Essigsäure, 190 cem 40–50 %iger Alkohol.

5. Verfahren von Rusconi<sup>2)</sup>. 100 cem Harn werden mit 10 cem Barytwasser versetzt, nach 10 Minuten wird filtriert, der Niederschlag ausgewaschen und im Wasserbade getrocknet.

Der Niederschlag gibt eine Reihe von Eiweissreaktionen. 1. Reaktion von Acrée<sup>3)</sup>: Der Niederschlag wird mit Formaldehydlösung (1:5000) versetzt und dann konzentrierte Schwefelsäure unterschichtet. Es tritt Violettfärbung an der Berührungsstelle ein. 2. Biuretreaktion. 3. Die Reaktion von Adamkiewicz. 4. Die Millonsche Reaktion.

Der Niederschlag ist nicht löslich in 2/1 n HCl, nicht löslich in heissem Wasser, nicht löslich in überschüssigem Barytwasser. Daher schliesst Rusconi Albumosen, Peptone sowie Nucleoalbumin aus.

<sup>1)</sup> A. Ott, Verhandl. d. 13. Kongr. f. inn. Med. 1895. — Zentralbl. f. inn. Med. 16. Beilage zu Nr. 21. 38. 1895.

<sup>2)</sup> A. M. Rusconi, Arch. di farm. sperim. 8. 34. 1909. — Chem. Zentralbl. 1909. I. 1252.

<sup>3)</sup> S. F. Acrée, Americ. Chemic. Journ. 37. 604.



Nach dem, was vorher über die Bedeutung der einzelnen Eiweissreaktion gesagt ist, sind die angeführten Reaktionen nicht als Beweise anzusehen; jedoch scheint die Unlöslichkeit der die Reaktionen gebenden Substanz in den genannten Lösungsmitteln dafür zu sprechen, dass wirklich Eiweiss in den Barytniederschlag übergegangen ist. — Heinrich<sup>1)</sup> hat bei einer Nachprüfung die Angaben Rusconis nur zum Teil bestätigen können.

Simader kombiniert das Verfahren von Posner mit der Dialyse. Er lässt den mit Essigsäure versetzten, filtrierten Harn 24 Stunden stehen und filtriert nochmals, um so eine eventuell entstandene Mucinfällung zu entfernen. Dann wird auf  $\frac{1}{10}$  bis  $\frac{1}{20}$  Volum eingengt. Nunmehr wird durch Dialyse die Hauptmenge der Salze entfernt und dann entweder durch die gewöhnlichen Eiweissreagentien oder durch Schütteln mit Chloroform das Eiweiss nachgewiesen.

Lecorché und Talamon haben Zweifel daran geäussert, dass der nach Posner gewonnene Niederschlag auch wirklich Eiweiss enthält. Nach Simader sind diese Zweifel aber nicht berechtigt, da der durch Essigsäure-Ferrocyankalium erzeugte Niederschlag sowohl die Millonsche Reaktion, als auch die Biuretprobe gab.

Simadar<sup>2)</sup> fand nach Entfernung der Mucinsubstanz (s. oben) auch bei Tieren stets Eiweiss (Pferd, Hammel, Rind, Stier, Hund), wobei er es aber unentschieden lässt, ob das Eiweiss des normalen Harns Albumin oder Globulin oder Nucleoalbumin ist.

Bellocq<sup>3)</sup> will mit dem Tan retschen Quecksilberreagens Eiweiss als normalen Harnbestandteil nachgewiesen haben.

Versuche von Heinrich<sup>4)</sup>, aus dem neutralisierten Harn mit neutralem Bleiacetat das normale Harniweiss auszufällen und dann im Niederschlag nachzuweisen, führten zu keinem befriedigenden Ergebnis; ebensowenig Versuche mit Bleiessig und mit Bleiessig und Ammoniak. Dagegen gelang ihm der Nachweis sicher mit Spiegler's Reagens. Er spricht die nach Zerlegung des Niederschlags mit  $\text{SH}_2$  erhaltene Eiweisssubstanz mit grosser Wahrscheinlichkeit als Serumalbumin an.

Die Menge der nichtdialysablen Stoffe des Harns wurden von Mme. Eliacheff<sup>5)</sup>, sowie neuerdings von Sasaki, Savaré, Ebbecke bestimmt. Die letztgenannten Untersucher benutzten Schilfschläuche, in welchen sie den Harn 24—48 Stunden der Dialyse unterwarfen (s. S. 19). Die Menge der nicht dialysablen Stoffe beträgt nach Sasaki 0,218 bis 0,68 g im Liter. Bei Fieber, sowie bei Eklampsie war die Menge beträchtlich vermehrt (Sasaki, Savaré). Die Menge ist abhängig vom Stoffumsatz, bei Männern grösser wie bei Frauen, bei Hunden deutlich abhängig von der Nahrungszufuhr (Ebbecke). Bei Pneumonie sind diese Stoffe ebenfalls vermehrt. Im normalen Harn liessen sich Chondroitinschwefelsäure, Nucleinsäure, geringe Mengen von Proteinen im adialysablen Rückstand nachweisen. Bei Pneumonie

<sup>1)</sup> O. L. Heinrich, Diss. Rostock 1910.

<sup>2)</sup> P. Simader l. c.

<sup>3)</sup> Bellocq, Journ. pharm. chim. [6] 11. 478. 1899.

<sup>4)</sup> Otto Lang Heinrich, l. c.

<sup>5)</sup> Mme. Eliacheff, Mem. de la Soc. de Biol. [9] 3. 71. 1891. — K. Sasaki, Hofmeisters Beiträge 9. 386. 1907. — M. Savaré, ebenda 9. 400 und 11. 71. 1907. — U. Ebbecke, Biochem. Zeitschr. 12. 485. 1908.

war eine peptonartige Substanz in grösserer Menge, neben geringeren Mengen von Albumosen, im adialysablen Rückstand enthalten.

Lichtwitz und Rosenbach<sup>1)</sup> stellten fest, dass der Harn des Menschen Kolloide enthält, welche auf kolloidale Goldlösung einen Schutz ausüben. Beteiligt sind an der Schutzwirkung die eiweissfällenden Substanzen und das komplexe Kohlehydrat Salkowskis.

## II. Die verschiedenen Eiweissstoffe des Harns.

### I. Albumin.

A. Eigenschaften. Wahrscheinlich sind im Blutserum, aus welchem das Eiweiss des Harns stammt, mehrere Albumine enthalten.

Nach Halliburton<sup>2)</sup> kommen dem vom Globulin vollständig befreiten Serum drei verschiedene Koagulationspunkte zu. — Es koaguliert bei 73°, 77° und 84°. Halliburton bezeichnet diese drei Arten als  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Albumin. Das bei 73° gerinnende ist in grösster, das bei 84° gerinnende in geringster Menge vorhanden. Beim Ochsen, Schaf und Pferd, welche zu den Ungulaten gehören, fehlt das  $\alpha$ -Albumin, beim Kaninchen, Menschen, Affen, Schwein, beim Hund und der Katze ist es vorhanden. Corin und Ansiaux bewirkten eine Trennung des im Rindsblutserum enthaltenen Albumin dadurch, dass sie beim Beginn einer Trübung die Temperatur konstant hielten, die sich danach abscheidenden Flocken abfiltrierten und in Wasser lösten (vgl. S. 1086). Diese Koagulation wurde mit den einzelnen Fraktionen wiederholt. Es ergab sich, dass das  $\beta$ -Albumin bei 73—74°, das  $\gamma$ -Albumin bei 79—80° koagulierte, wenn das Globulin durch Magnesiumsulfat abgeschieden war; in Gegenwart von Ammonsulfat lagen die Koagulationspunkte um einige Grade tiefer. — Reale<sup>3)</sup> unterscheidet ein Euserumalbumin (Koag.-Temp. 72°) und ein Pseudoserumalbumin (Koag.-Temp. 84°).

Die Erfahrungen beim Aussalzen sprechen auch für die Existenz mehrerer Serumalbumine. Nach Oppenheimer<sup>4)</sup>, der ältere Versuche von Kauder erweiterte, lassen sich zwei Fraktionen gewinnen, von denen die eine bei 66 $\frac{2}{3}$ % Sättigung fällbar ist, die andere dagegen nicht fällbar. Beide Fraktionen sind durch eine freie Zone voneinander geschieden. Gürber gelang es, aus Pferdeblutserum neben amorphem Albumin krystallisierendes Albumin abzuscheiden.

Gürber hat im Verein mit seinen Schülern Michel und Meyer<sup>5)</sup> aus Pferdeblutserum durch fraktionierte Fällung mit Ammonsulfat zwei solche Albu-

<sup>1)</sup> Lichtwitz u. O. Rosenbach, Zeitschr. f. physiol. Ch. **61**. 112. 1909. **64**. 144. **72**. 215. S. auch Lichtwitz, Diss. Göttingen 1909.

<sup>2)</sup> W. D. Halliburton, Journ. of Physiol. **5**. 158 u. 192. 1884.

<sup>3)</sup> E. Reale, Nuova rivista clin. terap. 1906.

<sup>4)</sup> C. Oppenheimer, Arch. f. Physiol. 1903. 201. — G. Kauder, Arch. f. exper. Pathol. u. Pharm. **20**. 411. 1886.

<sup>5)</sup> A. Gürber, Sitzungsber. d. physik.-med. Gesellsch. zu Würzburg 1894. 143. — A. Michel, Zur Kenntnis der Gürberschen Serum-Albumin-Krystalle. Nebst einem Nachtrag von Gürber. Würzburg, Stahelsche Buchh. 1895; Verhandl. d. physik.-med. Gesellsch. zu Würzburg [2] **29**. 117; Jahresber. f. Tierch. 1895; 11; Chem. Zentralbl. 1896. I. 759; Zentralbl. f. d. med. Wissensch. 1896. 152; Zentralbl. f. Physiol. **10**. 41. — G. Meyer, Weitere Beiträge zur Kenntnis der Krystallisation des Serumeiweisses. Diss. Würzburg, Scheiner, 1896. — Fr. N. Schulz, Die Krystallisation von Eiweissstoffen und ihre Bedeutung für die Eiweisschemie. Jena, Verlag Gustav Fischer. 1901. — A. Wichmann, Zeitschr. f. physiol. Ch. **27**. 575. 1899.

mine dargestellt, von denen das eine (Fraktion I) in bis 1 mm grossen, positiv doppelbrechenden, sechsseitigen Prismen krystallisiert, welche an dem einen Ende eine sechsseitige Pyramide tragen, am anderen aber abgerundet oder flach begrenzt sind. Dieses Albumin koaguliert in wässriger Lösung bei 51—53°, in 0,6%iger Kochsalzlösung bei 64° und besitzt die spezifische Drehung von  $[\alpha]_D = -61,0$  bis  $-61,2^\circ$ . Die Fraktion II krystallisiert in rechtwinkligen Tafeln. Zwei andere in Nadeln krystallisierende Albumine (Fraktion III und IV) erwiesen sich als Produkte der Einwirkung des Ammonsulfats auf das Albumin der Fraktion I. Das der Fraktion III koaguliert bei 56—58° und hat  $[\alpha]_D = -64^\circ$ . — Nach den Untersuchungen von Schulz und von Wichmann handelt es sich aber beim krystallisierten Serumalbumin um ein einheitliches Präparat, soweit sich das überhaupt für Eiweissstoffe feststellen lässt.

Nur das Serum vom Pferd liefert leicht krystallisierendes Albumin, das vom Ochsen, Hammel, Schwein, vom Hund, Kaninchen und von der Katze dagegen nicht. Auch das Serum vom Pferd gab nicht immer krystallisierendes Albumin, sondern nur das von ganz gesunden Tieren, deren Serum mehr Albumin als Globulin enthielt; aus Serum mit mehr Globulin als Albumin konnten die Krystalle nicht erhalten werden. Durch Zusatz von Säure (Schwefelsäure) lässt sich aus Pferdeblut mit Ammonsulfat stets wenn auch in wechselnder Ausbeute krystallisiertes Albumin gewinnen. Auch aus Kaninchenserum kann man nach der „Säuremethode“ mit einiger Sicherheit Albuminkrystalle gewinnen (Krieger, Inagaki). — Gruzewska<sup>1)</sup> erhielt durch längeres Abkühlen von Oxalatplasma, das mit dem gleichen Volum konzentrierter Ammonsulfatlösung versetzt war, auf  $-1^\circ$  auch Krystalle bei Meerschwein, Katze, Ochs, Natter.

Die bisher vorliegenden Beobachtungen genügen nicht, um die Existenz mehrerer Serumalbumine sicher zu beweisen.

Bei eiweisshaltigem Harn schwankt die Koagulationstemperatur nach Gerhardt zwischen 56 und 81°, nach Lauder Brunton und d'Arcy Power<sup>2)</sup> zwischen 55,6 und 82,2°. Welche von den möglichen Einflüssen dabei im Spiele sind, ist nicht bekannt. Die niedersten Temperaturen sind aber wohl auf die Gegenwart eines Globulins zu beziehen.

Die hier angeführten Eigenschaften des Albumins beziehen sich auf das native oder auf solches, welches durch Neutralsalze vom Globulin getrennt und durch Dialyse vom Salz befreit war.

Der Körper heisst Albumin und nicht Albumen, wie man öfter zu sagen beliebt; Albumen bedeutet das Weisse im Ei, ist also ein anatomischer, kein chemischer Begriff.

1. Das durch Verdunsten einer Albuminlösung bei niederer Temperatur (bei 40° oder im trockenen Vakuum) erhaltene Albumin stellt eine spröde, schwach durchscheinende, von Beimengungen gelbe Masse dar.

2. In kaltem Wasser oder in Wasser von 40—50° löst sich das Albumin zu einer klaren, etwas klebenden, leicht filtrierenden Flüssigkeit. Die Lösung erfolgt leichter, wenn man das trockene Eiweiss

<sup>1)</sup> H. Th. Krieger, Diss. Strassburg 1899. — J. Inagaki, Verhandl. d. physik.-med. Gesellsch. in Würzburg, N. F. 38. Nr. 1. 175. 1905. — S. Gruzewska, C. r. de l'Acad. des sciences 128. 1535. 1899.

<sup>2)</sup> C. Gerhardt, Archiv f. klin. Med. 5. 214. — Lauder Brunton und d'Arcy Power, St. Bartholomews Hosp. Reports 13. 283.



zunächst mit wenig Wasser zu einem dicken Brei verreibt und erst dann allmählich mehr Wasser zusetzt (Schulz). In Alkohol ist das Serumalbumin unlöslich. Versetzt man eine Albuminlösung reichlich mit Alkohol, so entsteht ein flockiger Niederschlag, der sich im Wasser wieder löst, wenn er bald aus der alkoholischen Flüssigkeit entfernt wird, dagegen nur zum Teil oder fast gar nicht, wenn er längere Zeit unter Alkohol aufbewahrt wird. Unter schwachem Alkohol wird das Albumin nach Hammarsten<sup>1)</sup> vollständiger unlöslich als unter starkem.

3. Über das Verhalten des Albumins zu Salzen vgl. S. 1086.

4. Albumin diffundiert sehr schwer, doch, nach Gottwalt<sup>2)</sup>, leichter als Globulin.

5 Die spezifische Drehung des (menschlichen) Albumins ist von Starke<sup>3)</sup> bestimmt worden zu  $[\alpha]_D = -62,6$  bis  $-64,59^\circ$ .

Das Albumin war aus Ascitesflüssigkeit oder Hydrocele dargestellt. Für Albumin aus Pferdeblutserum fand Starke  $[\alpha]_D = -60,05^\circ$ , für solches aus Rindsbloodserum Sebelien<sup>4)</sup>  $[\alpha]_D = -60,1$  und  $62,6^\circ$ . Das Albumin aus Pferdeblut besass nach Analysen von Hammarsten eine etwas andere Zusammensetzung als das aus den serösen Flüssigkeiten des Menschen und enthielt namentlich weniger Schwefel (1,80 % gegen 2,28 %). Vgl. Gürber S. 1101.

6. Eine in passender Weise angesäuerte Albuminlösung scheidet in der Wärme unter Abnahme der sauren Reaktion das Eiweiss in Flocken aus. Die Koagulationstemperatur hängt von verschiedenen Umständen ab; bei natürlichen Eiweisslösungen liegt sie in der Hauptsache bei 72—73<sup>0</sup>. Vgl. Halliburton, S. 1101.

Eine durch Diffusion möglichst salzarm gemachte Albuminlösung gerinnt bei einer verhältnismässig niederen Temperatur (Haas), etwa 50<sup>0</sup> (Starke<sup>5)</sup>. Ganz salzfreie Serumalbuminlösung gerinnt dagegen nicht beim Erhitzen (Erb).

Durch Zusatz von Chlornatrium steigt nach Starke sowie Gürber (S. 1101) die Gerinnungstemperatur und bei einem Gehalt der Flüssigkeit an Chlornatrium von 5 % tritt die Koagulation nach Starke erst bei etwa 75—80<sup>0</sup> ein. Gleiches gilt nach Corin und Ansiaux (S. 1086) vom Magnesiumsulfat. Der Harnstoff erhöht nach Lauder Brunton, d'Arcy Power und Spiro die Gerinnungstemperatur; ebenso wirken mehrwertige Alkohole der Fettreihe, wie Glycerin, Mannit, Traubenzucker, Dextrin (Spiro). Vermutlich unter Bildung von Alkalialbuminat wirken gerinnungshemmend organische Basen (Spiro). Methylalkohol und Äthylalkohol setzen die Koagulationstemperatur herab. Sättigen einer Albuminlösung mit Neutralsalz hat nur einen geringfügig erhöhenden (bei Natriumsulfat) oder vermindernenden (bei Natrium- und Kaliumnitrit) Einfluss auf die Gerinnungstemperatur (Halliburton)<sup>6)</sup>. Ein steigender Gehalt der Lösung an Albumin

<sup>1)</sup> Hammarsten, Zeitsch. f. physiol. Ch. 6. 222. 1882.

<sup>2)</sup> E. Gottwalt, Zeitschr. f. physiol. Ch. 4. 423. 1880.

<sup>3)</sup> K. V. Starke, Jahresber. f. Tierch. 1881. 17. — W. Erb, Zeitschr. f. Biol. 41. 309. 1901.

<sup>4)</sup> J. Sebelien, Zeitschr. f. physiol. Ch. 9. 459. 1885.

<sup>5)</sup> Starke, l. c. — Erb, l. c.

<sup>6)</sup> K. Spiro, Zeitschr. f. physiol. Ch. 30. 182. 1900. — W. D. Halliburton, Journ. of Physiol. 5. 158 u. 192. 1884. — K. Spiro, Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol. 4. 300. 1904.



setzt nach Starke die Koagulationstemperatur herab. In nicht hinlänglich sauren Flüssigkeiten liegt die Gerinnungstemperatur höher, in zu stark sauren niedriger als bei richtigem Säuregehalt.

Bevor sich das Albumin bei der Koagulation in Flocken abscheidet, trübt sich die Flüssigkeit, zuerst zwischen 60 und 65°; bei den in höherer Temperatur gerinnenden Albuminen tritt die Trübung 1—2° vor dem Koagulationspunkt ein. Erhitzt man eine mit Ammonsulfat gesättigte Albuminlösung einige Zeit in strömendem Dampf, so löst sich das Albumin auch nach Entfernung der Salzlösung nach Devoto<sup>1)</sup> nicht mehr in Wasser, gleichgültig welche Reaktion die Lösung vor dem Salzzusatz besass.

7. Das Albumin wird durch Alkalihydrate oder alkalisch reagierende Salze (Alkalicarbonat oder normales und einfach saures Alkaliphosphat), sowie durch Säuren angegriffen, um so schneller, je mehr Reagens zugegen und je höher die Temperatur ist. Dieses Verhalten des Albumins ist für den Nachweis und die Abscheidung des Albumins, und da sich das Globulin dem Eiweiss ganz gleich verhält, des Eiweisses überhaupt von Wichtigkeit.

a) Das Albumin wird durch Alkalihydrat oder alkalisch reagierendes Salz unter Abspaltung von  $\text{NH}_3$  und  $\text{SH}_2$  zu Albuminat (früher als Protein bezeichnet) verwandelt. Da dieses in Wasser und namentlich in salzhaltigem Wasser viel schwerer löslich ist als das Albumin, so erhält man aus konzentrierten und besonders aus salzreichen Albuminlösungen trübe, bei geringerer Konzentration mehr oder minder klare Flüssigkeiten. Entzieht man dem Albuminat durch Zusatz einer Säure alle Basis, so fällt das Albuminat in deutlichen Flocken innerhalb der wasserklaren Flüssigkeit aus. Ist das Albuminat aus reinem Albumin durch einen Überschuss von Alkalihydrat oder Alkalicarbonat erhalten worden, so wird die Flüssigkeit bei allmählichem vorsichtigem Zusatz von Säure neutral, bleibt aber in Gegenwart einer genügenden Menge Wasser klar, die Lösung enthält jetzt neutrales Albuminat. Bei weiterem Zusatz von Säuren trübt sich die Flüssigkeit milchig und nimmt saure Reaktion an, indem jetzt das schwerer lösliche saure Albuminat entsteht (Huppert); fährt man mit dem Zusetzen von Säure fort, so scheidet sich endlich das völlig in Freiheit gesetzte Albuminat aus wieder neutral und klar gewordener Flüssigkeit in Flocken ab. Fügt man noch einen Überschuss an Säure hinzu, so geht nun Acidalbumin mit saurer Reaktion in Lösung.

Bei der Fällung des Albuminats verhalten sich nach einer von Huppert ausgeführten Untersuchung alle als Reagentien gebräuchlichen Säuren gleich, es wird von jeder das zur Basenbindung erforderliche Äquivalent verbraucht. Dagegen findet bei der Lösung des Albuminats ein Unterschied zwischen den Mineralsäuren und der Essigsäure statt; von den Mineralsäuren braucht man nämlich zur Lösung gleicher Mengen Albuminat gleiche Moleküle, wobei die Salzsäure und die Salpetersäure normales, die Schwefelsäure saures Salz bilden, von der Essigsäure ist dagegen zur Erzielung einer Lösung eine viel grössere als die einer Mineralsäure äquivalente Menge erforderlich. Kommt es darauf an, aus einer Albuminatlösung das Protein mittelst einer Säure möglichst vollständig abzuschneiden, so bedient man sich daher dazu besser der Essigsäure als einer Mineralsäure, weil man bei Verwendung von Essigsäure weniger Gefahr läuft, durch einen Überschuss an Säure Albuminat wieder in Lösung zu bringen, als bei Anwendung einer Mineralsäure. Das zweifach saure Phosphat fällt das Albuminat wie eine Säure, unterscheidet sich von diesen jedoch dadurch, dass es das Albuminat im Überschuss nicht merklich wieder löst. Mit fortschreitender Einwirkung des Alkali entstehen primäre Albumosen, sekundäre Albumosen, Peptone (Maas)<sup>2)</sup>. Es nimmt also nach Erreichen eines Optimum die

<sup>1)</sup> Devoto, Zeitschr. f. physiol. Ch. 15. 465. 1891.

<sup>2)</sup> O. Maas, Zeitschr. f. physiol. Ch. 30. 61. 1900.

erhaltbare Menge von Albuminat wieder ab. Wie Alkalien können auch organische Basen wirken.

b) Diese Verhältnisse erleiden eine Abänderung bei gleichzeitiger Gegenwart von Phosphaten. Normales und einfach saures Phosphat hält Albuminat in Lösung; eine solche Phosphate enthaltende Albuminatlösung kann erst dann einen Albuminatniederschlag geben, wenn diese Phosphate durch Zusatz von Säure in zweifach saures Phosphat verwandelt sind. Nach Soyka beginnt die Fällung des Albuminats, wenn 0,9 der gesamten Phosphorsäure in zweifach saures Phosphat übergeführt ist und ist vollständig, wenn die Flüssigkeit nur zweifach saures Phosphat enthält. Die Fällung des Albuminats erfolgt bei Gegenwart von Phosphat demnach unter ganz denselben Bedingungen, wie die Fällung des Albumins aus seiner mit Magnesiumsulfat gesättigten Lösung. Eine Lösung mit 0,9 Mol. zweifach- und 0,1 Mol. einfach saurem Phosphat reagiert aber sauer. Bei Gegenwart von Phosphat in einer Albuminatlösung fällt also das Albuminat erst aus, wenn die Flüssigkeit saure Reaktion angenommen hat. Durch Zusatz von Neutralsalzen zu einem durch Hitze ganz unkoagulierbaren Laugeneiweiss kann die Hitzegerinnbarkeit mehr oder weniger restituiert werden (Pauly und Handowsky)<sup>1)</sup>.

c) Natürliche Eiweisslösungen, wie das Serum, enthalten alkalisch reagierende Salze in genügender Menge, um alles Albumin (und Globulin) beim Kochen in Albuminat überzuführen. Ist die seröse Flüssigkeit hinlänglich verdünnt, so erscheint sie fast klar. Auf Zusatz von Säure tritt dann zunächst gleichmässige Trübung ein, darauf Abscheidung des Albuminats in Flocken. Wenn die Fällung vollendet ist, besitzt die Flüssigkeit wegen ihres Gehalts an Phosphat saure Reaktion. Selbstverständlich kann man aus einer Eiweisslösung beim Kochen sofort einen flockigen Niederschlag in wasserklarer Flüssigkeit erhalten, wenn man die Lösung vor dem Erhitzen entsprechend ansäuert. Nur findet zwischen dem vorläufigen und dem nachträglichen Ansäuern insofern ein Unterschied statt, als sich, wie Huppert fand, zweifach saures Phosphat enthaltende Albuminatlösungen herstellen lassen, welche nicht schon in der Kälte, wohl aber erst beim Kochen einen flockigen Niederschlag von koaguliertem Eiweiss geben.

Von einer serösen Flüssigkeit unterscheidet sich eiweisshaltiger Harn bei saurer Reaktion nur dadurch, dass in ihm das zweifach saure Phosphat überwiegt, ohne dass er ganz frei von einfach saurem Phosphat zu sein braucht. Ein eiweisshaltiger Harn von saurer Reaktion kann also beim Kochen sogleich einen flockigen Niederschlag in wasserklarer Flüssigkeit geben, ohne dass jedoch deshalb alles Eiweiss gefällt sein muss.

d) Kocht man in der Kälte gefälltes Albuminat, so schrumpfen die Flocken auf ein viel kleineres Volumen ein und sind nun, in der Kälte, in Basen oder in Säuren nicht mehr so leicht löslich als vorher. Von derselben Beschaffenheit ist das durch Kochen einer passend angesäuerten Eiweisslösung direkt erhaltene koagulierte Protein.

8. Durch Einwirkung von Säuren entsteht aus Albumin Acidalbumin. Dieses ist in einem Überschuss der konzentrierten gewöhnlichen Mineralsäuren (Salzsäure, Schwefelsäure, Salpetersäure), sowie in Neutralsalzlösungen (Panum)<sup>2)</sup> unlöslich, dagegen in Essigsäure gewöhnlicher Konzentration löslich.

Daher gibt eine Albuminlösung, wenn sie mit einer der gewöhnlichen Mineralsäuren in einem gewissen Überschuss versetzt wird, einen Niederschlag, mit Essigsäure aber nicht. Nicht alle Mineralsäuren fällen das Protein (Albumin) gleich

<sup>1)</sup> Soyka, Pflügers Archiv 12. 351. 1876. — W. Pauly u. H. Handowsky, Biochem. Zeitschr. 24. 239. 1910.

<sup>2)</sup> P. Panum, Virchows Archiv 4. 428. 1852.

gut; von der Salzsäure ist am meisten erforderlich, um den Niederschlag von Acidalbumin zu erzeugen, von der Salpetersäure braucht man dagegen nach Molekülen am wenigsten (Huppert). Die Salpetersäure fällt daher das Albumin am besten. Das gefällte Acidalbumin löst sich in viel Wasser, ebenso in einem sehr grossen Überschuss der Säure wieder auf, in der Wärme leichter als in der Kälte.

Serumalbumin ist gegen Säure viel widerstandsfähiger wie Eialbumin. 0,25 %ige HCl oder 2 %ige  $\text{HC}_3\text{COOH}$  bildet bei Zimmertemperatur überhaupt kein Acidalbumin (kein Neutralisationsniederschlag), bei 40° erst nach 14 Tagen. 2 %ige HCl bildet bei gewöhnlicher Temperatur erst nach 14 Tagen, 14—15 %ige HCl bei 40° erst nach vielen Stunden Acidalbumin (Goldschmidt). Bei höherer Temperatur (Siedetemperatur) geht die Umwandlung wesentlich rascher vor sich. Bei andauernder Säurewirkung entstehen Albumosen, Peptone, Kyrine. Das gebildete Acidalbumin ist durch Neutralsalze sehr leicht fällbar (Umber<sup>1)</sup>).

Auch durch Phenol wird das Eiweiss gefällt, während aber natürliche Eiweisslösungen nur mit nahezu gesättigter wässriger Phenollösung Niederschläge geben und zwar wie es nach Zapolsky<sup>2)</sup> scheint nicht mit dem Albumin, sondern mit den in jenen enthaltenen Globulinen, wird eine natürliche Eiweisslösung bei Gegenwart von Essigsäure auch durch wenig Phenol gefällt.

B. Nachweis. Für klinische Zwecke nimmt man beim Aufsuchen von Albumin auf das gleichzeitig vorhandene Globulin, da beide vielfach die gleichen Reaktionen geben, zumeist keine Rücksicht. Die im folgenden zunächst angeführten Proben für den Nachweis von Eiweiss im Harn beziehen sich daher auf ein Gemisch beider Substanzen. Von den aufgezählten Reaktionen zeigen die sehr empfindlichen auch die im normalen Harn enthaltenen Spuren an.

Für den Nachweis geringer Mengen Eiweiss soll der Harn klar sein; sicher klar erhält man ihn beim Filtrieren durch Asbest oder Kieselgur.

#### 1. Füllen als koaguliertes Eiweiss (Kochprobe).

a) Allgemeine Vorschrift. Handelt es sich um den Nachweis nicht minimaler Spuren von Eiweiss im Harn, so erhitzt man etwa 10 ccm Harn im Reagenzglas bis zum Sieden und versetzt dann, gleichgültig ob während des Kochens ein Niederschlag entstanden ist oder nicht, mit Salpetersäure bis zur stark sauren Reaktion, wozu man in gewöhnlichen Fällen etwa 10—20 Tropfen einer 25%igen Salpetersäure braucht. Zeigt der Harn danach einen flockigen Niederschlag, so darf die Gegenwart von Eiweiss als erwiesen betrachtet werden.

Eiweisshaltiger Harn kann allerdings und wird in den meisten Fällen beim Kochen für sich einen Niederschlag geben, welcher aus koaguliertem Eiweiss besteht. Aber nicht jeder Harn, welcher beim Kochen für sich einen Niederschlag gibt, enthält Eiweiss. Schwach alkalischer oder amphoterer Harn kann beim Kochen einen Niederschlag von normalem Kalkphosphat (vgl. S. 120) liefern, der ebenso flockig ist, wie ein Eiweissniederschlag und sich in seinem Aussehen durchaus nicht von Eiweiss unterscheidet. Einen Phosphatniederschlag erkennt man aber an seiner Löslichkeit in Säuren als solchen und wählt zu dieser Prüfung konzentrierte

<sup>1)</sup> Goldschmidt, Diss. Strassburg 1898. — F. Umber, Zeitschr. f. physiol. Ch. 25. 258. 1898.

<sup>2)</sup> N. Zapolsky, Hoppe-Seylers med. chem. Untersuchungen. 1871. 557.



Salpetersäure, weil ein mässiger Überschuss von dieser einen Albuminniederschlag ungelöst lässt. Die Salpetersäure ist also der Essigsäure vorzuziehen. Auch kann die Auflösung der Phosphate durch Essigsäure unvollständig sein, indem sich ein in Essigsäure bei Siedetemperatur unlösliches Dicalciumphosphat bildet (de Jager). — Siebold<sup>1)</sup> empfahl zunächst mit  $\text{NH}_3$  die Phosphate zu fällen und das wieder angesäuerte Filtrat zur Kochprobe zu verwenden.

Im alkalischen Harn enthaltenes Eiweiss wird für gewöhnlich beim Kochen nicht als Albuminat in Lösung bleiben, weil das Albuminat beim Kochen als Kalk- und Magnesiaverbindung ausfallen würde. Fehlen einem Harn die Erdphosphate, so kann bei alkalischer Reaktion die Fällung beim Kochen ausbleiben. De Jager beobachtete das bei einer Gravida mit Urämie, der Ca-Lactat verabreicht war.

Ein solcher Harn koaguliert sowohl bei Zusatz von Chlorcalciumlösung, als auch beim Ansäuern. Entfernt man aus dem Harn das Ca durch Zusatz von Kaliumoxalat, so tritt im Filtrat beim Kochen nur dann Koagulation ein, wenn primäres Phosphat (zweifach saures) oder freie Säure vorhanden ist; ist nur sekundäres Phosphat zugegen, so koaguliert Ca-freier Harn nicht (de Jager)<sup>2)</sup>.

In einem mit etwas Säure, namentlich Essigsäure, versetzten Harn kann dagegen Eiweiss beim Kochen in Lösung bleiben. In beiden Fällen wird es durch Salpetersäure niedergeschlagen.

Die mucinartige Substanz des Harns, welche auch als Begleiterin des Eiweisses auftritt, scheidet sich auf Zusatz von Essigsäure zu dem kalten Harne als homogene Trübung, aus dem noch heissen Harn als stärkere Trübung oder in Flocken aus, wird aber durch Salpetersäure (oder andere Mineralsäuren) in Lösung erhalten.

Es muss ausdrücklich davor gewarnt werden, dem Harn vor dem Kochen Säure zuzusetzen, falls derselbe nicht durch Zersetzung abnorme alkalische Reaktion angenommen hatte, die natürlich durch vorsichtige Neutralisation beseitigt werden muss. Falscher Säurezusatz kann beträchtliche Eiweissmengen der Hitzekoagulation entziehen (siehe auch Schweissinger)<sup>3)</sup>.

Setzt man einem schwach eiweisshaltigen Harn, der beim Kochen klar geblieben ist, die Salpetersäure nur tropfenweise zu, so verschwindet der Niederschlag anfangs wieder beim Umschütteln der Flüssigkeit, oder es braucht anfangs auch gar kein Niederschlag zu entstehen. Jeder Eiweiss-harn zeigt diese Erscheinung, wenn man ihn mit dem fünffachen Volumen Wasser verdünnt hat. Ein Niederschlag tritt dagegen auf, entweder wenn der Harn so reich an Salzen ist, dass das gebildete Acidalbumin nicht in Lösung gehen kann, oder wenn die Flüssigkeit mit so viel Salpetersäure versetzt wird, dass das Acidalbumin nun in der Säure unlöslich ist.

Setzt man zu künstlich konzentriertem Harn Eiweiss, so fällt die Kochprobe intensiver aus, als im Vergleichsharn; ist der Harn sehr stark eingeeengt, so bleibt die Kochprobe negativ (Hallauer)<sup>4)</sup>, hemmende Wirkung des Harnstoffs.

Bei der Verwendung dieser Eiweissprobe können kleine Mengen Albumin dem Nachweis entgehen, weil sich auch das koagulierte Albumin in der heissen Salpetersäure unter Zersetzung teilweise löst. Man muss sich daher vollends hüten, den Harn nach dem Zusatz der Salpetersäure noch weiter zu kochen oder ihn schon vor dem Kochen mit Salpetersäure zu versetzen.

<sup>1)</sup> Siebold, Zeitschr. f. analyt. Ch. 13. 248.

<sup>2)</sup> L. de Jager, Zeitschr. f. physiol. Ch. 62. 333. 1909. — S. auch Nederl. Tijdschr. v. Geneesk. 1909. II. 466.

<sup>3)</sup> Schweissinger, Münch. med. Wochenschr. 51. 1172. 1904.

<sup>4)</sup> Hallauer, Münch. med. Wochenschr. 50. 1539. 1903.



Bei der Untersuchung des Harns nach der in Rede stehenden Methode werden ausgeschlossen: der im normalen Harn enthaltene mucinähnliche Körper, weil er durch den starken Zusatz von Salpetersäure in Lösung erhalten wird, und die Albumosen, weil sie wenigstens so lange im Harn gelöst bleiben, als derselbe noch heiss ist.

Dagegen können nach diesem Verfahren im Harn Niederschläge auftreten, die nicht aus Eiweiss bestehen: Harnsäure oder harnsaure Salze im konzentrierten normalen Harn (Säugetierharn sind im allgemeinen sehr konzentriert), und eigentümliche unlösliche Säuren (Harzsäuren) nach innerlicher oder äusserer Anwendung von Harzen (Terpentin, Benzoe), Balsamen (Copaiva-, Peru-, Tolubalsam, Cubeben, Storax, Santelholzöl), Petroleum. Auch Gallenfarbstoff kann, worauf Grocco<sup>1)</sup> aufmerksam macht, aus stark ikterischen Harnen ausfallen. Bei sehr harnstoffreichen Tierharnen kann auch salpetersaurer Harnstoff auskrystallisieren. Diese Niederschläge lassen sich jedoch vom Eiweiss unterscheiden.

*α)* Die Harnsäure und die harnsauren Salze fallen, wenn sie es überhaupt tun, aus dem Harn meist als gefärbte Pulver aus; man braucht also nur dann an der Gegenwart von Albumin zu zweifeln, wenn der Niederschlag nicht flockig ist. Um sich zu versichern, ob der Niederschlag aus Eiweiss besteht, filtriert man ihn ab und unterwirft ihn einer der Farbenreaktionen (S. 1089), am besten der Biurettreaktion, oder der Probe von Adamkiewicz, oder versucht ihn in warmer Essigsäure zu lösen und prüft die Lösung mit Ferrocyankalium auf Eiweiss. Verdünnen des Harns auf das drei- oder vierfache Volumen vor der Probe kann die Ausscheidung der Harnsäure hintanhaltend. Da es sich aber in diesen zweifelhaften Fällen nur um sehr geringe Mengen von Eiweiss handeln kann, so prüft man zweckmässig eine neue Probe mit Ferrocyankalium (Seite 1112), nach Heller (Seite 1110), oder einer der anderen schärferen Eiweissproben.

*β)* Die organischen Säuren (Harzsäuren), welche statt oder neben Eiweiss aus Harn ausfallen können, unterscheiden sich vom koagulierten Albumin durch ihre Löslichkeit in Alkohol. Nach Alexander ist diese Unterscheidung aber nicht zuverlässig, da auch gefälltes Acidalbumin in Alkohol unter gewissen Umständen ganz klar löslich ist. — Versetzt man den Harn nach dem Kochen mit  $\frac{1}{3}$  Vol. Salpetersäure, so rührt nach Alexander<sup>2)</sup> eine Trübung nur von Eiweiss her, die Harzsäuren bleiben in Lösung.

*γ)* Der aus ikterischem Harn ausfallende Gallenfarbstoff besteht vorwiegend aus Biliverdin, und dieses ist in Alkohol löslich.

*δ)* Der salpetersaure Harnstoff charakterisiert sich durch seine Krystallform. Wiederholen der Probe nach dem Verdünnen mit Wasser (1:1) zeigt, dass es sich nicht um Eiweisskoagulation handelt.

#### b) Modifikationen der Kochprobe.

*α)* Mit Essigsäurezusatz. Man erhitzt ca. 10 ccm Harn zum Sieden und setzt dann 2—3 Tropfen 25%iger Essigsäure hinzu. Für die Verwendung ausserhalb eines Laboratoriums wäre die Essigsäure viel angenehmer. Die Probe mit Essigsäure ist aber nicht so zuverlässig, wie die mit Salpetersäure. Ein Überschuss von Essigsäure löst das Eiweiss sehr leicht wieder auf, namentlich wenn das Kochen bei alkalischer Reaktion stattgefunden hat (siehe vorher). Auch ist das

<sup>1)</sup> Grocco, Rev. gener. ital. di clin. med. 1891; Zentralbl. f. klin. Med. 13. 1892.

<sup>2)</sup> C. Alexander, Deutsche med. Wochenschr. 14. 323. 1892; Zeitschr. f. analyt. Ch. 33. 121.

Mucin in Essigsäure nicht löslich; es kann also eine Mucintrübung Eiweiss vortäuschen.

Manche pathologische Harnen geben trotz erheblichem Eiweissgehalt (0,32 bis 0,35 %) beim Aufkochen unter Zusatz von Essigsäure keine Eiweissfällung. Nach Sättigen mit schwefelsaurem Natrium scheiden aber auch diese Harnen das Eiweiss vollständig ab (Delannay)<sup>1)</sup>.

β) Mit Salzzusatz. Die Koagulation wird begünstigt durch einen höheren Salzgehalt. Auch wird etwa beim Kochen entstehendes Albuminat oder Acidalbumin bei einem höheren Salzgehalt nicht in Lösung gehalten, sondern gefällt. Bei dünnen Harnen mit geringem Eiweissgehalt ist daher die Gefahr, dass Eiweiss übersehen wird, am beträchtlichsten. Es ist daher in zweifelhaften Fällen sicher ein Zusatz konzentrierter Salzlösung empfehlenswert.

Man versetzt 10 ccm Harn mit einigen ccm konzentrierter NaCl-Lösung und verfährt im übrigen wie oben. Auch andere Neutralsalze können benutzt werden (Na-Sulfat, Ammoniumsulfat). Dufau empfiehlt 10 ccm Harn mit 1 ccm einer Lösung von 250 g Natriumcitrat und 50 g 90%igem Alkohol in Wasser zu einem Liter aufgefüllt zu kochen.

γ) Neuerdings mehrfach empfohlen (Bychowsk u. a.)<sup>2)</sup>, aber schon länger bekannt ist folgendes Verfahren: Man erhitzt 10 ccm destilliertes Wasser zum Sieden und lässt einen Tropfen Harn hereinfallen. Es entsteht um den fallenden Tropfen eine leichte Opaleszenz, die an Zigarrenrauch erinnert.

δ) Nach de Jager<sup>3)</sup>: 10 ccm unfiltrierter Harn werden mit etwa 1 ccm 20%iger Kaliumoxalatlösung versetzt und nach einigen Minuten durch doppeltes Filter filtriert. Oftmals ist ein klares Filtrat nur nach wiederholtem Filtrieren zu erhalten. Die filtrierte Flüssigkeit wird zum Sieden erhitzt. Entsteht ein Niederschlag, so ist mit Gewissheit Eiweiss anwesend. — Eine zweite Probe des Filtrates wird nach Zusatz von 2—3 Tropfen verdünnter Essigsäure gekocht. Bleibt der Harn klar, so ist gewiss kein Eiweiss vorhanden.

Bei einem Eiweissgehalt von 0,05 g im Liter ergab sich ein geringer Niederschlag, bei 0,06 g im Liter ein deutlicher Niederschlag.

Die theoretische Begründung dieser Modifikation s. vorher S. 1107 Absatz 3.

Siebold<sup>4)</sup> empfahl den Harn mit  $\text{NH}_3$  stark zu alkalisieren, dann die Phosphate abzufiltrieren und im mit Essigsäure angesäuerten Filtrat die Kochprobe anzustellen.

ε) Ein praktisch auch von anderen schon verwandter Kunstgriff besteht darin, dass man das Reagenzglas zu etwa  $\frac{2}{3}$  mit filtriertem Harn füllt, dann an der Kuppe das Reagenzglas anfasst und nunmehr nur das obere Drittel des Harns

<sup>1)</sup> R. Delannay, J. Pharm. Chim. [6] 9. 100. 1899.

<sup>2)</sup> S. Zentralbl. f. d. Krankh. d. Harn- u. Sexualorgane 14. 235. 1903. — Bychowsk, Deutsche med. Wochenschr. 1902. 33.

<sup>3)</sup> l. c.

<sup>4)</sup> Siebold, Zeitschr. f. analyt. Ch. 13. 248. 18.

ins Sieden bringt. Man hat dann den unteren kalt gebliebenen Teil des Harns bequem zum Vergleich (Engels)<sup>1)</sup>.

Nach Henn<sup>2)</sup> ist die Kochprobe im normalen Hunde-, Pferde- und Rinderharn negativ.

## 2. Fällung als Acidalbumin.

a) Durch konzentrierte Salpetersäure (Hellersche Probe)<sup>3)</sup>.

Man schichtet den Harn vorsichtig auf konzentrierte Salpetersäure, so dass sich die Flüssigkeiten nicht mischen. Enthält der Harn Albumin, so bildet sich an der Grenzschicht beider Flüssigkeiten eine nach oben und unten scharf begrenzte, ringförmige Trübung. Die Schichtung nimmt man am besten vor, indem man auf ein Reagenzglas, das 3—5 ccm starke Salpetersäure enthält, einen kleinen Trichter mit Filter setzt, das Reagenzglas möglichst stark neigt und nunmehr Harn langsam durch das Filter laufen lässt, so dass derselbe an der Wandung des Reagenzglases herabläuft, nicht aber frei heruntropft. Man schichtet so ebenfalls 3—5 ccm Harn auf. Die Beobachtung der Trübung geschieht gegen einen dunklen Hintergrund.

L. Steiner<sup>4)</sup> hat für die Überschichtung einen besonderen Apparat angegeben, der aber wohl entbehrlich ist. Zwei in ihrem unteren Teile durch ein schräges Verbindungsröhrchen verbundene Reagiergläser werden so benutzt, dass man in das Reagierglas, in welchem die Verbindungsöffnung etwas höher liegt, Salpetersäure giesst, jedoch nur so viel, dass die Öffnung des Verbindungsrohrs nicht erreicht wird. Dann filtriert man Harn in das zweite Reagenzglas. Wenn das Reagenzglas sich stärker füllt, läuft Harn in das erste Reagenzglas über und schichtet sich auf die Salpetersäure.

Die Versuchsanordnung ist bei der Hellerschen Probe insofern günstig für das Gelingen des Albuminnachweises, als das Acidalbumin an der Stelle, wo es gebildet wurde, sogleich auf so viel Säure trifft, dass es unlöslich bleibt.

Die Probe ist empfindlich, es lassen sich mit ihr noch Spuren Eiweiss erkennen (25 mg im Liter nach Almén), doch entgehen im Harne nach Mörner (s. vorher) Mengen bis zu 78 mg im Liter dem Nachweis. De Jager fand bei einem Eiweissgehalt von 0,05 ‰ die Hellersche Probe negativ, bei 0,06 ‰ schwach positiv. Fast ausnahmslos zeigt der Harn nach Mörner<sup>5)</sup>, auch wenn der Eiweissring in der Grenzschicht fehlt, eine 0,5—1 cm über dieser gelegene schwache ringförmige oder diffuse Trübung, die sich bisweilen auch gegen die Salpetersäure erstreckt. Sie rührt her von der mucinähnlichen Substanz und kann, in harnsäurereichen Harnen, auch herrühren von der Harnsäure. Verdünnt man den Harn vor der Probe mit 2—3 Vol. Wasser, so bleibt der Uratniederschlag aus, während die durch die mucinähnliche Substanz bedingte Trübung bestehen bleibt oder bisweilen selbst deutlicher hervortritt. Diese Niederschläge kommen durch das schwache Ansäuern des Harns zustande. Die diagnostische Bedeutung dieser Mucintrübung ist naturgemäss eine andere, wie die des typischen, an der Berührungsstelle liegenden, schmalen, scharf begrenzten Eiweissrings (Linossier)<sup>6)</sup>.

<sup>1)</sup> Fr. Engels, Deutsche med. Wochenschr. 56. 1330. 1909.

<sup>2)</sup> W. Henn, Zeitschr. f. Tiermed. 13. 209. 1910.

<sup>3)</sup> Heller, Archiv f. physiol. u. pathol. Ch. u. Mikroskopie 5. 169. 1852.

<sup>4)</sup> L. Steiner, Münch. med. Wochenschr. 56. 1742. 1909.

<sup>5)</sup> K. A. H. Mörner, Skandin. Archiv 6. 402.

<sup>6)</sup> G. Linossier, Jahresber. f. Tierch. 27. 735. 1897.



Durch die Probe werden auch die Albumosen und die Harzsäuren gefällt. — In sehr konzentrierten Harnen kann ein Niederschlag von salpetersaurem Harnstoff auftreten; derselbe ist im Gegensatz zum Harnsäureniederschlag deutlich krystallisiert und bleibt nach nur mässigem Verdünnen des Harns vor der Probe aus. — Die farbigen Ringe, welche neben dem Niederschlag auftreten, haben mit der Eiweissreaktion nichts zu tun. Zur Konservierung mit Thymol versetzte Harne geben bei der Hellerschen Probe einen ringförmigen Niederschlag, der mit Eiweiss verwechselt werden kann. Das Thymol lässt sich durch Schütteln mit dem gleichen Volum Petroläther (im Reagenzglas) entfernen (Weinberger)<sup>1)</sup>.

Sachs<sup>2)</sup> bringt auf einem Objektträger, der auf dunklem Grunde liegt, einen Tropfen Salpetersäure mit einem daneben liegenden Tropfen Harn zusammen. Bei stärkerem Eiweissgehalt bildet sich augenblicklich, bei schwächerem (unter 0,2 ‰) nach kurzer Zeit ein dichtweisser, grauer oder graublauer Schleier, der sich meist halbmondförmig über den Säuretropfen ausbreitet. Spuren bis 0,01 ‰ sind noch erkennbar.

Weiss empfiehlt bei der Hellerschen Probe den Harn mit dem 4—8 fachen Vol. Wasser zu verdünnen. Michel empfiehlt eine mit  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  gesättigte  $\text{NO}_3\text{H}$ , die durch ihr hohes spez. Gewicht die Schichtung erleichtert. — Schnitter<sup>3)</sup> empfiehlt allgemein bei Ringproben die spezifisch leichtere Flüssigkeit in eine Pipette einzusaugen, mit dem Finger abzuschliessen, dann die Pipette äusserlich zu reinigen und in die spezifisch schwerere Flüssigkeit einzutauchen. Beim Öffnen des Fingers treibt die einströmende schwerere Flüssigkeit die leichtere nach oben, wobei besonders schöne Ringbildung eintritt.

Nach Henn<sup>4)</sup> ist die Hellersche Probe im unverdünnten normalen Hundeharn positiv, also zur Diagnose kleiner abnormer Eiweissmengen unbrauchbar.

Im künstlich konzentrierten Harn mit geringem Eiweisszusatz ist die Hellersche Probe negativ. Beim Verdünnen wird sie dann positiv. Konzentrierte Harne sind daher zu verdünnen (Hallauer)<sup>5)</sup>.

b) Fällung durch Neutralsalze aus saurer Lösung. Dafür sind folgende Vorschriften vorhanden.

α) Versetzt man eine Eiweisslösung bzw. Harn mit Essigsäure bis zu stark saurer Reaktion und mit dem gleichen Volumen einer gesättigten Glaubersalzlösung (Panum, S. 1105) oder Magnesiumsulfatlösung oder mit mindestens so viel ( $\frac{1}{6}$  Vol.) einer gesättigten Kochsalzlösung, dass das Gemisch 4% Kochsalzlösung enthält (Heynsius), so wird beim Kochen alles Eiweiss gefällt. Manche Harne geben mit Essigsäure + Kochsalz schon in der Kälte Eiweissfällungen (Salkowski)<sup>6)</sup>.

Die Albumosen lösen sich in der heissen Flüssigkeit und der mucinähnliche Körper des normalen Harns wird nicht oder unvollständig niedergeschlagen. Nach Stokvis<sup>7)</sup> entsteht beim Kochen manchmal ein mehr oder minder deutlich flockiger Niederschlag, der kein Eiweiss ist, und aus Farbstoffen, auch Gallenfarbstoff bestehen kann.

<sup>1)</sup> W. Weinberger, Proc. Soc. Exp. Biol. a. Med. 6. 4—7. 1909.

<sup>2)</sup> Fr. Sachs, Deutsche med. Wochenschr. 33. 58. 1907.

<sup>3)</sup> H. Weiss, Diss. Erlangen 1910. (J. T. 30. 332). — Fr. Michel, Chemikerztg. 35. 183. 1901. — Schnitter, Münchn. med. Wochenschr. 58. 629. 1911.

<sup>4)</sup> W. Henn, Ztschr. f. Tiermed. 13. 209. 1910.

<sup>5)</sup> Hallauer, Münchn. med. Wochenschr. 50. 1539. 1903.

<sup>6)</sup> Heynsius, Pflügers Archiv 10. 239. — E. Salkowski, Zentralbl. f. d. med. Wissenschaft. 1880. Nr. 38.

<sup>7)</sup> Stokvis, Tijdschr. voor Geneesk., Bijl. 115. 1882; Virchow-Hirschs Jahresber. 1882. I. 170.



Im Pferdeharn bekommt man durch Essigsäure allein eine Mucintrübung (Eber, Henn)<sup>1)</sup>, was diese Probe beeinträchtigt.

β) Roberts<sup>2)</sup> empfiehlt als Reagens auf Eiweiss im Harn eine mit 5% Salzsäure von 1,052 Dichte versetzte, gesättigte Kochsalzlösung, von welcher man dem Harn in der Kälte das gleiche Volumen hinzufügt.

Auch kann man den Harn auf die saure Salzlösung schichten, wonach bei Anwesenheit von Eiweiss an der Berührungsfläche beider Flüssigkeiten ein Niederschlag auftritt. Die Reaktion ist nach Roberts so empfindlich wie die Hellersche Probe, hat vor dieser aber den Vorzug, dass der Harn nicht dunkler gefärbt wird und keinen Niederschlag von Harnsäure gibt. — Durch das Reagens werden auch die Albumosen und die Harzsäuren gefällt. — Hundeharn sowie oft Pferdeharn und Rinderharn reagieren auch normalerweise positiv (Henn).

Garrat<sup>3)</sup> bestätigt, dass die Probe sehr scharf ist.

γ) Ein anderes von Roberts<sup>4)</sup> angegebenes Reagens besteht aus einer Mischung von 1 Teil starker Salpetersäure und 5 Teilen gesättigter Bittersalzlösung. Es verhält sich wie die Mischung von Salzsäure und Kochsalz. Auch bei dieser Probe kann man den Harn auf die Salzlösung schichten. Nach Maguire ist die Probe sehr scharf.

Da auch das gebildete Acidalbumin in Alkohol löslich ist, so lassen sich die Harzsäuren von ihm, nicht so wie vom koagulierten Eiweiss, durch ihre Löslichkeit in Alkohol unterscheiden. Setzt man aber nach Roberts die Salzlösung dem Harn tropfenweise hinzu, so verschwindet die entstehende Trübung beim Umschütteln anfangs wieder, wenn sie aus Eiweiss besteht, während der von Harzsäuren herührende Niederschlag dauernd ist und auf Zusatz von überschüssigem Harn nicht wieder verschwindet.

Alexander<sup>5)</sup> gibt noch folgende unterscheidende Reaktionen an. Auf Zusatz von 2—3 Tropfen Salzsäure zu 8—10 cem Harn fallen nur die Harzsäuren; erhitzt man die Probe unter Zusatz von noch mehr Säure, so tritt bei Gegenwart von Harzsäuren Rotfärbung ein. Essigsäure fällt das Eiweiss nicht, aber die mucinähnliche Substanz und die Harzsäuren; die Säuren sind in überschüssiger Essigsäure löslich. Man kann auch die Harzsäuren aus dem mit viel Essigsäure versetzten Harn durch Schütteln mit Äther entfernen und die rückständige Flüssigkeit dann auf Eiweiss untersuchen.

Gallenfarbstoff löst sich, wie aus dem koagulierten Harn, in Alkohol mit grüner Farbe. Erweist sich der Gallenfarbstoff bei diesen Proben störend, so soll man nach Grocco den Harn nach Zusatz von 2—3 Vol. Essigsäure einige Stunden stehen lassen und ihn erst dann, wenn das Filtrat mit Essigsäure klar bleibt, auf Eiweiss untersuchen.

### 3. Fällung durch spezifische Reagentien.

a) Fällung durch Ferrocyanwasserstoff (S. 1088). Man versetzt den Harn reichlich mit Essigsäure und darauf mit einigen Tropfen Ferrocyankalium; bei Gegenwart von Eiweiss entsteht ein dichter, weisser Niederschlag (Hilger)<sup>6)</sup>. Mit dieser Reaktion lassen sich noch Spuren Eiweiss auffinden.

<sup>1)</sup> Eber, Zentralbl. f. d. med. Wissensch. 1886. 561. W. Henn l. c. 210.

<sup>2)</sup> Wm. Roberts, Lancet II. 15. 1882; Virchow-Hirschs Jahresber. 1882. 1. 169; Zeitschr. f. analyt. Ch. 22. 628; Chem. Zentralbl. 1883. 424.

<sup>3)</sup> J. M. Garrat, New York med. Journ. 1898.

<sup>4)</sup> Roberts, Chem. Zentralbl. 1885. 412. — Maguire, Lancet, June 1886. 1082; Virchow-Hirschs Jahresber. 1886. 1. 157.

<sup>5)</sup> C. Alexander, Deutsche med. Wochenschr. 14. 323. 1893; Zeitschr. f. analyt. Ch. 33. 121.

<sup>6)</sup> Hilger, Arch. d. Pharm. [3] 6. 388.

Ferrocyanwasserstoff (Essigsäure und Ferrocyankalium) fällt nur das Harnpepton (aus Neutralsalzlösung) und wahrscheinlich auch die reine Deuteroalbumose (Kutscher) nicht; die Niederschläge mit den Albumosen sind bei Gegenwart von überschüssiger Essigsäure in der Wärme löslich, ferner in Neutralsalzlösungen die Niederschläge der Prot- und der Deuteroalbumose.

Von den Eiweisskörpern geben nur noch die Albumosen und das Nucleoalbumin mit Ferrocyanwasserstoff auch Niederschläge; die Niederschläge der Albumosen lösen sich aber in viel Essigsäure, namentlich in der Wärme, sowie, mit Ausnahme des der Heteroalbumose, auch in Neutralsalzlösung (Chlornatrium, Ferrocyankalium).

Trübt sich der Harn auf Zusatz von Essigsäure allein, was bei Pferdeharn die Regel ist, so kann diese Trübung herrühren entweder von dem mucinähnlichen Körper des normalen Harns, was jedoch selten der Fall ist, oder von den mehrfach erwähnten Harzsäuren; diese lösen sich leicht in Alkohol. Von der mucinähnlichen Substanz befreit man den Harn, wenn man ihn unter Vermeidung eines Überschusses mit so viel essigsaurem Blei versetzt, dass ein flockiger Niederschlag entsteht. Das (bleifreie) Filtrat trübt sich mit Essigsäure nicht mehr, und die Prüfung mit Ferrocyankalium gibt ein unzweideutiges Resultat.

Reinste Ammoniumsalze geben mit Ferrocyanwasserstoff eine Trübung (Bardach)<sup>1)</sup>. Verwendet man Kieselgur als Klärmittel, so geben die Filtrate auch häufig mit Ferrocyanwasserstoff Trübung durch gelöste Spuren von Eisen. Auch geringer Eisengehalt des Filtrierpapiers kann zu Trübungen Anlass geben (Bardach).

Auch Zink aus zum Auffangen des Harns benutzten Gefässen kann mit Ferrocyanwasserstoff eiweissähnliche Trübungen geben (Schmidt<sup>2)</sup>).

Setzt man zu künstlich konzentriertem Harn Eiweiss, so ist die Probe mit Ferrocyanwasserstoff negativ, beim Verdünnen wird sie positiv; die phosphorsäuren Salze sollen hemmend wirken (Hallauer)<sup>3)</sup>.

Statt Essigsäure kann man zum Freimachen des Ferrocyanwasserstoffs auch Zitronensäure benutzen (Pavy).

Harnsäure kann bei der Essigsäure-Ferrocyankaliumprobe sich plötzlich als staubförmiger Niederschlag ausscheiden (Schweissinger)<sup>4)</sup>.

In mit Bittersalz gesättigter Albuminlösung entsteht der Niederschlag nach Kowalewsky<sup>5)</sup> schwer.

b) An Stelle von Ferrocyankalium hat Mya<sup>6)</sup> das Nitroprussidnatrium vorgeschlagen.

c) Rhodankalium nach Zouchlos. Das Reagens besteht aus einer Mischung von 100 cem 10 % igem Rhodankalium mit 20 cem Essigsäure. Von ihm setzt man dem Harn einige Tropfen zu. Nach Ollendorf zeigt es noch 0,005 %, nach Schick 0,007 % Eiweiss an, lässt aber nach Ollendorf eine Verwechselung mit Harnpepton zu, nach Schick zwar eine Verwechselung mit Albumosen, aber nicht mit Harnpepton. Ein Niederschlag tritt aber nach Mörner erst auf Zusatz grosser Mengen Rhodankalium ein. — Statt der Lösung hat Zouchlos eine trockene Mischung von Rhodankalium und Bernsteinsäure vorgeschlagen; mit diesen geben nach Ollendorf nur noch 0,007 % Eiweiss einen Niederschlag, und nach Schick ist die Empfindlichkeit etwas geringer, als bei Verwendung

<sup>1)</sup> B. Bardach, Zeitschr. f. analyt. Ch. 43. 554. 1904.

<sup>2)</sup> H. Schmidt, Wien. klin. Wochenschr. 20. 228. 1907.

<sup>3)</sup> Hallauer, Münch. med. Wochenschr. 50. 1539. 1903.

<sup>4)</sup> Schweissinger, Münch. med. Wochenschr. 51. 1172. 1904.

<sup>5)</sup> Kowalewsky, Petersburger med. Wochenschr. 31. 1887; Jahresber. f. Tierch. 1887. 4.

<sup>6)</sup> G. Mya, Arch. d. Pharm. 225. 500; Zeitschr. f. analyt. Ch. 27. 124.

von Essigsäure. — Nach dieser letzteren Modifikation können auch im normalen Hunde-, Pferde-, Rinderharn Trübungen auftreten (Henn<sup>1)</sup>).

d) Die Fällung durch Metaphosphorsäure wurde zuerst von Grigg, dann von Hindenlang<sup>2)</sup> zum Nachweis von Eiweiss im Harn angewandt.

Metaphosphorsäure fällt alle Eiweisskörper, mit Ausnahme des Peptons (Hofmeister); nach Dillner sowie Obermayer<sup>3)</sup> werden zwar Albumosen in konzentrierter Lösung von der Säure gefällt, lösen sich aber im Überschuss der Säure leicht wieder auf.

Die Probe ist nach Hindenlang so empfindlich wie die Kochprobe und die Probe mit Ferrocyanwasserstoff, wird aber nach Dillner durch die Hellersche Probe übertroffen. Albumose wird gleichfalls gefällt, ebenso Harnsäure. Die Reaktion scheint nicht ganz verlässlich zu sein, da auch manche gegen andere Proben eiweissfreie Harn Trübungen geben (Penzoldt, von Noorden). Sättigen der Albuminlösung mit Bittersalz schwächt nach Kowalewsky<sup>4)</sup> die Empfindlichkeit ab.

Man kann die Metaphosphorsäure in Substanz und in Lösung anwenden; in Lösung geht die Säure aber leicht in gewöhnliche Phosphorsäure über, durch welche Eiweiss nicht gefällt wird. Nach Blum<sup>5)</sup> soll diese Umwandlung langsamer erfolgen, wenn man der 10 %igen Säurelösung auf 100 cem eine Lösung von 0,03 bis 0,05 g Manganchlorür in verdünnter Salzsäure und einige Messerspitzen Bleisuperoxyd hinzufügt und filtriert. Die Lösung ist schön rosenrot, so lang Metaphosphorsäure als solche vorhanden ist.

e) Trichloressigsäure, zuerst von Grossstern und Fudakowsky, dann wieder von Raabe und von Kowalewsky empfohlen; sie fällt die Albumosen (Pepton) nicht oder unvollständig, der Niederschlag löst sich in der Wärme (Martin, Obermayer<sup>6)</sup>).

Die Trichloressigsäure (S. 1088) wendet man nach Raabe in der Weise an, dass man in 1 cem filtrierten Harn in einem engen Reagenzglas ein kleines Stück der Säure wirft; bei Gegenwart von Eiweiss entsteht an der Grenze zwischen Harn und der entstandenen Lösung der Säure eine scharf abgegrenzte, trübe Zone. Normaler Harn gibt keine ähnliche Reaktion; harnsäurereicher kann eine diffuse Trübung aufweisen, die aber beim Erwärmen verschwindet oder überhaupt nicht auftritt, wenn man den Harn vorher verdünnt. Die Probe soll empfindlicher sein, als die mit Metaphosphorsäure und die Hellersche. — Die Trichloressigsäure kann dem Harn auch in konzentrierter Lösung zugesetzt werden. — Reale erwärmt mit Trichloressigsäure zum Sieden, wobei die Fällung intensiver wird.

<sup>1)</sup> C. Zouchlos, Wien. allg. med. Zeitg. 1. 2. 1890; Zeitschr. f. analyt. Ch. 29. 380. — A. Ollendorf, Deutsche Medizinalztg. 1893. 77; Zeitschr. f. analyt. Ch. 33. 120. — R. Schick, Prager med. Wochenschr. 1890. 306. — K. A. H. Mörner, Skandinav. Archiv 6. 369. 1896. — Henn, l. c.

<sup>2)</sup> W. C. Grigg, Brit. med. Journ., May 29, 1880. 809; Jahresber. f. Tierch. 1880. 1. — C. Hindenlang, Berl. klin. Wochenschr. 1881. 205.

<sup>3)</sup> F. Hofmeister, Zeitschr. f. analyt. Ch. 21. 151. — H. J. Dillner, Jahresb. f. Tierch. 1882. 209. — F. Obermayer, Wiener med. Jahrb. 1889. 375; Zentralbl. f. Physiol. 1889. 223.

<sup>4)</sup> H. J. Dillner, Jahresber. f. Tierch. 1882. 209. — C. v. Noorden, Arch. f. klin. Med. 38. 222. 1885. — Kowalewsky, Petersburg. med. Wochenschr. 31. 1887; Jahresber. f. Tierch. 1887. 4.

<sup>5)</sup> L. Blum, Chem. Zentralbl. 1887. 345.

<sup>6)</sup> Grossstern u. Fudakowsky, bei Kowalewsky, Zeitschr. f. analyt. Ch. 24. 551. 1885. — A. Raabe, Pharm. Zeitschr. f. Russland 20. 445; Zeitschr. f. analyt. Ch. 21. 303. — N. Kowalewsky, a. a. O. — C. J. Martin, Journ. of Physiol. 15. 376. — F. Obermayer, a. a. O. — E. Reale, Jahresber. f. Tierch. 27. 344. 1897.



f) Salicylsulfonsäure (S. 1088) kann im Harn direkt gelöst werden, indem man einige Krystalle von Salicylsulfonsäure hinzugebt, oder man setzt tropfenweise eine ca. 20%ige Lösung von Salicylsulfosäure dem Harn zu (O. Mayer). Roch bereitet ein Reagens, indem er 13 g Salicylsäure in 20 g  $\text{H}_2\text{SO}_4$  in der Wärme löst und dann nach dem Erkalten 67 ccm Wasser hinzusetzt. Koch verwendet eine gesättigte wässerige Lösung, ebenso Murray<sup>1)</sup>. Die Probe nach Roch so empfindlich wie die Hellersche Probe, zeigt nach William noch Eiweiss bei einer Verdünnung von 1:130 000 an. Gibt mit normalem Harn keinen Niederschlag (Roch), fällt die Harnsäure nicht (Roch, William)<sup>2)</sup>, auch nicht die Harzsäuren (William).

Albumosen werden zum Teil gefällt; die Niederschläge lösen sich beim Erwärmen, während das Albumin sich nicht beim Erwärmen löst (Stein)<sup>3)</sup>.

Nach Mankiewicz entsteht bei einem Eiweissgehalt von 0,001% eine bläuliche Färbung, bei 0,003 % Opalescenz, bei 0,005—0,01 % ein Niederschlag mit weisslicher Färbung, bei 0,02 % eine ganz dichte Trübung. Praun versetzt einige ccm filtrierten Harn mit einigen Tropfen konzentrierter Lösung von Salicylsulfosäure und schichtet dann von dem filtrierten Harn darüber. So hat man den gemischten Harn und den Vergleichsharn im selben Reagenzglas und kann noch Trübungen feststellen, die sich sonst nicht wahrnehmen lassen. Die Probe ist demnach etwas schärfer wie die Hellersche Probe, nach Neumann überhaupt die schärfste Eiweissprobe. Auch Cammidge<sup>4)</sup> hält dieselbe für die beste und zuverlässigste.

Slowzoff<sup>5)</sup> beschreibt einen eigenartigen, albumoseähnlichen Eiweisskörper, der sich periodisch im Morgenharn findet, der mit Salicylsulfosäure einen Niederschlag bildet, der sich in der Wärme wieder auflöst.

Oxyphenylschweflige Säure, welche  $\frac{1}{3}$  Sulfosalicylsäure enthält, fällt nach Bourceau<sup>6)</sup> ausschliesslich das koagulierbare Eiweiss, nicht aber Albumosen, Peptone, Alkaloide, Antipyrin, Salicylate, Urate, Phosphate.

g) Asaprol ( $\beta$ -Naphthol- $\alpha$ -Sulfosäure). Man setzt zu 4—5 ccm Harn 1—2 Tropfen Salzsäure und 10 Tropfen 10%ige Asaprollösung oder verwendet eine 10%ige Asaprollösung, welche mit 0,1 Vol. Salzsäure versetzt ist. Zeigt 0,01 % Eiweiss an (Riegler).

h) Aseptol (Orthophenolsulfosäure) kommt in 33 $\frac{1}{3}$ %iger Lösung in den Handel. Zu 5 ccm Harn 15—20 Tropfen. Fällt Eiweiss noch bei 0,005 %, ist aber nicht so haltbar wie Asaprol (Riegler)<sup>7)</sup>.

<sup>1)</sup> G. Roch, Pharmak. Zentralhalle 42. 393. 1901. — O. Mayer, Schweiz. Wochenschr. f. Ch. u. Pharm. 45. 446. 1907. — Koch, Zeitschr. f. wissensch. Mikroskop. 1894. 407. — Murray, Zeitschr. d. österr. Apoth.-Vereins 1904. 578.

<sup>2)</sup> G. Roch, Pharmak. Zentralh. 30. 549. 1889; Zeitschr. f. analyt. Ch. 29. 241. — J. A. Mac William, Brit. med. Journ. 1891. 1. 837. u. 1892. 1. 115; Zeitschr. f. analyt. Ch. 30. 749; 31. 483.

<sup>3)</sup> R. Stein, Chem. Zentralbl. 1898. I. 225.

<sup>4)</sup> Mankiewicz, Chem. Zentralbl. 1900. I. 630. — A. Praun, Deutsche med. Wochenschr. 27. 220. 1901. — J. Neumann, Diss. Erlangen 1891. — P. P. Cammidge, Lancet 1899. 22. April.

<sup>5)</sup> W. Slowzoff, Wratsch. 1906. Nr. 7.; Jahresber. f. Tierch. 36. 313. 1906.

<sup>6)</sup> Bourceau, Compt. rend. Soc. Biol. 49. 317. 1897.

<sup>7)</sup> E. Riegler, Wien. klin. Wochenschr. 52. 981. 1894; Wien. med. Blätter 35. 1895. 551; Chem. Zentralbl. 1895. 1. 362 und 1083.



Barral<sup>1)</sup> schichtet filtrierten Harn auf eine 20 %ige Lösung von Aseptol. Bei Anwesenheit von Gallenfarbstoff entsteht ein grüner Ring, bei Anwesenheit von Eiweiss ein weisser Ring (noch bei 5 mg im Liter). Auch Albumosen werden gefällt, die Niederschläge lösen sich beim Erwärmen.

i) Pikrinsäure. Tropft man normalen Harn in eine kalt gesättigte Pikrinsäurelösung, so bleibt sie klar, während nach jedem Tropfen eiweisshaltigen Harns ein weisser Niederschlag in Streifen zu Boden sinkt (Galippe). — Nach Hager mischt man Harn mit einem halben Volumen reiner Salzsäure und schichtet auf die Flüssigkeit kalt gesättigte Pikrinsäurelösung. Bei Gegenwart von Eiweiss entsteht an der Grenzzone eine Trübung und zwar fast augenblicklich, wenn Spuren Eiweiss vorhanden sind, sogleich, wenn der Harn 2% (!) Eiweiss enthält<sup>2)</sup>. — G. Johnson überschichtet den Harn mit dem gleichen Vol. kalt gesättigter Pikrinsäurelösung; sie muss im Überschuss vorhanden sein, wenn sie fällen soll. — Esbach<sup>3)</sup> bediente sich früher zur Fällung des Eiweisses bei seiner Art der quantitativen Bestimmung des Eiweisses einer Mischung von 9 Vol. Pikrinsäurelösung, mit 10,5 g Pikrinsäure im Liter, und 1 Vol. Essigsäure von 1,040 Dichte, neuerdings einer Lösung von 10 g Pikrinsäure und 20 g krystallisierte Zitronensäure im Liter. — Die Säure fällt alle Eiweisskörper, auch das Pepton und den mucinartigen Bestandteil des normalen Harns, ferner die Harnsäure sowie das Kreatinin (Jaffé, siehe S. 666) und Alkaloide (wie das Chinin, Hager). S. auch bei quantitativer Bestimmung nach Esbach.

Nach Johnson sollen sich die von Albumosen, dem Mucin, Alkaloiden und Uraten herrührenden Niederschläge beim Erwärmen wieder lösen; andererseits ist aber zu beachten, dass normaler Harn beim Kochen mit Pikrinsäure einen starken flockigen Niederschlag gibt (Huppert). Derartige Niederschläge treten nach meinen Erfahrungen nur bei Zusatz kleiner Pikrinsäuremengen auf, nicht bei Zusatz von reichlich Pikrinsäure (Schulz).

k) Die bereits von Owen Rees, später wieder von Almén empfohlene alkoholische, essigsäurehaltige Tanninlösung (4 g Tannin in 8 cem 25 %iger Essigsäure und 190 cem Weingeist von 40—50 %) fällt allerdings noch sehr geringe Mengen Albumin, aber sie gibt auch in normalem Harn mindestens Trübungen. Einen beträchtlichen Niederschlag erhält man nach Ott<sup>4)</sup> auf Zusatz Almén'scher Tanninlösung zu normalem Harn, welcher zur Hälfte mit Kochsalz gesättigt ist.

Tognetti<sup>5)</sup> empfiehlt folgendes Verfahren: Man löst 1,5 g Gerbsäure in 500 cem Alkohol. Davon fügt man 3 cem zu ebensoviel Harn und gibt noch 3 cem 25 %iges HCl hinzu. Bei Gegenwart von Eiweiss bleibt ein Niederschlag. Es sollen noch 1:200000 Eiweiss entdeckt werden können. Bei ikterischem Harn entfernt man den Farbstoff durch Zusatz von Eisessig.

l) Phenol. Méhu verwendet zum Fällen des Eiweisses behufs quantitativer Bestimmung desselben eine Lösung von je 1 Teil krystallisiertem Phenol und käuflicher Essigsäure in 2 Teilen Alkohol von 90 %; der Harn wird auf 100 Vol. mit 2—3 Vol. Salpetersäure und 10 Vol. der Phenollösung versetzt und geschüttelt, worauf sich der Niederschlag absetzt. Schneller erfolgt die Abscheidung des Niederschlags, wenn man statt der Salpetersäure ein halbes Volumen gesättigter

<sup>1)</sup> Barral, Presse médicale 1897. 121.

<sup>2)</sup> Die Angabe Hagers findet sich zuerst in dessen Handbuch d. pharm. Praxis 2. 1187. In der neuen Auflage 1907 fehlt dieselbe. Die Angabe, dass ein Harn mit 2% Eiweiss sogleich eine Trübung gebe, ist mir nicht verständlich, da so hoher Eiweissgehalt praktisch ja kaum vorkommt. (Schulz.)

<sup>3)</sup> Galippe, Gaz. méd. de Paris 10. 1873. 122. — H. Hager, Chem. Zentralbl. 1879. 696; Zeitschr. f. analyt. Chem. 19. 382. Pharmaz. Zentralh. 20. 337. 1879. — G. Johnson, Brit. med. Journ., May 1883. 504. 614 und Oktober 1884; Lancet II. 18. 1882 und Dezbr. 1884; Zeitschr. f. analyt. Ch. 23. 115; Virchow-Hirsch's Jahresber. 1882. 1. 162; 1883. 1. 257; 1884. 1. 241. — Esbach, Zentralbl. f. d. med. Wissensch. 1880. 430.

<sup>4)</sup> Ad. Ott, Prager Zeitschr. f. Heilkunde 16. 177. 1895.

<sup>5)</sup> A. Tognetti, Gazz. degli osped. 1906. Mai.

Glaubersalzlösung verwendet. — Ch. Meymott Tidy versetzt den Harn im Reagenzglas mit 10 Tropfen Alkohol von 0,805 Dichte und 10 Tropfen Phenol, worauf sich bei Gegenwart selbst nur von Spuren Eiweiss (1:15 000) Flocken abscheiden sollen; oder er fügt dem Harn 15 Tropfen Alkohol zu und darauf eine Lösung von Phenol in so viel Eisessig, dass sich die Lösung mit Wasser nicht mehr trübt. — Der Eiweissniederschlag, welchen das Méhusche Reagens gibt, verschwindet beim Erwärmen und gestattet keine Unterscheidung von Albumosen und Alkaloiden. Millard <sup>1)</sup> wendet daher ein Reagens an, welches aus 2 Gewichtsteilen krystallisiertem Phenol, 7 Eisessig und 22 Kalilauge (Normallauge) besteht; die Menge der Lauge soll genau eingehalten werden (sie ist der Menge des Phenols äquivalent). Man schichtet den Harn auf das Reagens. Niederschläge von Alkaloiden oder Pepton lösen sich in der Wärme und in Alkohol, Harzsäuren in Alkohol. Fällt Eiweiss noch bei 1:200 000; auch Garrat <sup>1)</sup> hält diese Reaktion für sehr scharf.

Reagiert der Harn nicht genügend sauer, so soll man ihn nach Ilimow mit zweifachsaurem phosphorsauren Natron ansäuern, den Mucinniederschlag sich absetzen lassen oder abfiltrieren und dann 5 %ige Phenollösung zufügen. Trete danach, auch bei Erwärmen, keine Trübung oder kein flockiger Niederschlag auf, so sei der Harn eiweissfrei. — Nach Lewis <sup>2)</sup> dagegen entstehen auch in ganz normalen Harnen auf Zusatz von Karbolsäure und Essigsäure flockige Niederschläge.

Colquhoun <sup>3)</sup> überschichtet den Harn mit einer gesättigten Lösung von Karbolsäure in absolutem Alkohol. Die Probe soll der Hellerschen Probe überlegen sein. — Fuchs benutzt eine Mischung von gleichen Teilen Phenol und Glycerin. Eiweisshaltiger Harn wird durch dieses Reagens getrübt oder gefällt. Empfindlichkeit 1:1000.

m) Sozodjodolsäure. Man löst 10 g Sozodjodolsäure (Dijodparaphenol-sulfosäure) in 100 cem Alkohol. 10 cem Harn versetzt man mit 10 Tropfen Reagens. Bei Anwesenheit von Eiweiss entsteht eine weisse Trübung oder ein Niederschlag, der beim Erwärmen nicht verschwindet (Guérin <sup>4)</sup>).

n) Wolframsäure und Molybdänsäure (S. 1088). Sonnenschein verwendet eine mit Essigsäure (oder Phosphorsäure) stark angesäuerte Lösung eines löslichen Salzes der Säuren, Maschke eine Lösung von 30 Teilen wolframsaurem Natron und 75 Teilen 30 %iger Essigsäure in 120 Teilen Wasser, Oliver <sup>5)</sup> eine Mischung aus einer 20 %igen Lösung von wolframsaurem Natron, einer 60 %igen Zitronensäurelösung und destilliertem Wasser zu gleichen Teilen. Jaworski eine Lösung von 1 Teil molybdänsaurem Ammon oder wolframsaurem Natron und 4 oder 5 Teilen Weinsäure in 40 Teilen Wasser. Nach Jaworski setzt man zu 4 cem mit Weinsäure angesäuertem Harn einige Tropfen des Reagens; Harn, der auf 200000 nur 1 Teil Eiweiss enthält, gibt in 2—3 Sekunden Trübung oder Niederschlag. Das Reagens gibt schon mit normalem Harn eine sehr deutliche Trübung (Huppert), fällt auch Harnpepton und Alkaloide, der Peptonniederschlag löst sich in der Wärme. Nach Sonnenschein löst sich der Wolframsäure-Niederschlag in Ammoniak; vorher ist die Phosphorsäure wegzuwaschen, weil sonst phosphorwolframsaures Ammon ausfällt.

<sup>1)</sup> Méhu, Journ. de pharm. et de chimie **9**. 95. 1869; Zeitschr. f. analyt. Ch. **8**. 522. — Tidy, The Lancet. 1870. **1**. 691; Zentralbl. f. d. med. Wissensch. 1870. 511. — Henry R. Millard, A treatise on Brights disease of the kidneys. Sec. edition. New York 1886. 65. — G. M. Garrat, Jahresber. f. Tierch. **29**. 294. 1899.

<sup>2)</sup> S. P. Ilimow, Petersburger med. Wochenschr. **26**. 1879; Zeitschr. f. analyt. Ch. **19**. 382. — W. M. B. Lewis, New York med. Record, Sept. 15. 1870. 319.

<sup>3)</sup> W. Colquhoun, The Lancet. 1899. 6. Mai. — Fuchs, Pharm. Zentralbl. 1903. 400.

<sup>4)</sup> G. Guérin, Journ. de Pharm. et Chim. [6]. **9**. 576. 1899.

<sup>5)</sup> O. Maschke, Zeitschr. f. analyt. Ch. **16**. 427. 1877. — Oliver, On bedside urine testings. London 1883, nach E. Lecorché u. Ch. Talamon, Traité de l'albuminurie. Paris 1888. 44. — Jaworski, Jahresb. f. Tierch. **22**. 192. 1892.

o) Chromsäure (S. 1088). Zusatz einiger Tropfen einer 5—10 %igen Lösung zu schwach angesäuertem eiweisshaltigem Harn bewirkt einen gelblichen flockigen Niederschlag (Rosenbach). — Ein Peptonniederschlag löst sich in der Wärme; es können auch Harzsäuren ausfallen (Guérin). — Kaliumbichromatlösung wirkt nicht direkt eiweissfällend, sondern erst nach Säurezusatz (Gies)<sup>1)</sup>.

p) Jodjodwasserstoff (S. 1088) aus 2 g Jod, 4 g Jodkalium in 500 ccm Wasser und 500 ccm starker Essigsäure. Fällt auch Alkaloide. Tanret<sup>2)</sup> schreibt dem Reagens dieselbe Empfindlichkeit zu wie dem Jodquecksilberkalium (1088).

q) Chlorkalk (S. 1088). Eine Mischung aus gleichen Volumen Harn und konzentrierter Salzsäure wird mit 2—3 Tropfen gesättigter Chlorkalklösung überschichtet. An der Grenzschicht weisser Saum. Zeigt noch 0,01 % Eiweiss an (Jolles).

Im alkalischen Harn der Herbivoren ist bei dieser Konzentration die Reaktion unscharf wegen der sich entwickelnden CO<sub>2</sub>-Blasen (Henn)<sup>3)</sup>.

r) Phosphorwolframsäure und Phosphormolybdänsäure sind zum Nachweis von Eiweiss im Harn nicht geeignet, weil sie viele normale Harnbestandteile fällen (S. 1087). Über Verwendung der Phosphorwolframsäure zum Nachweis von Albumosen s. dort.

s) Quecksilbersalze.

a) Quecksilberchlorid. Nach Zouchlos gibt Quecksilberchlorid in einem Eiweissarn eine durch Essigsäure nicht verschwindende Trübung, während in normalem Harn entweder eine Trübung ausbleibt oder durch einige Tropfen Essigsäure leicht zu beseitigen ist. Mit einer Mischung von 1 Teil Essigsäure und 6 Teilen einer 1 %igen Sublimatlösung wird zwar Eiweiss gefällt, es entsteht aber kein Niederschlag von Pepton, Harnsäure, Phosphorsäure. Schick bestätigt die Unfällbarkeit von Pepton und Albumose; das Reagens bewirkt aber in stark verdünnten Harnsäurelösungen Trübung und gestattet nur den Nachweis von 0,014 % Eiweiss. Auch Ollendorff<sup>4)</sup> findet die Probe nicht empfindlich genug.

Natriumquecksilberchlorid. Fürbringer<sup>5)</sup> schlägt ein Gemenge des Doppelsalzes von Quecksilberchlorid und Chlornatrium mit Zitronensäure (in Gelatinekapselfn von Apotheker Stütz in Jena) vor. Mayer löst 5 g HgCl<sub>2</sub>, 5 g Zitronensäure, 40 g NaCl in 500 ccm Wasser. Das Reagens ist fast so empfindlich, wie Tanrets Reagens, fällt im Gegensatz zu diesem Alkaloide nicht, gibt aber manchmal auch mit Harnen Trübung, in denen sich sonst kein Eiweiss nachweisen lässt. Sehr konzentrierte Harne, welche Harnsäure abscheiden könnten, müssen vor der Prüfung verdünnt werden.

Um die Schichtung zu erleichtern, empfiehlt Ravold das Spieglerse Reagens mit dem gleichen Volum konzentrierter Magnesiumsulfatlösung zu versetzen.

Spieglerse Reagens besteht aus einer Lösung von 8 g Sublimat, 4 g Weinsäure, 20 g Rohrzucker oder statt dessen, wegen der grösseren Haltbarkeit, besser 20 g Glycerin, in 200 ccm Wasser. Der mit einigen Tropfen Essigsäure versetzte, wenn nötig, filtrierte Harn wird auf das Reagens geschichtet. Es ist Eiweiss noch in der Verdünnung von 1 : 250 000 nachweisbar (nach Pollacci sogar 1 : 365 000), und normale Harne geben die Reaktion sehr häufig. Die Spieglerse Reaktion ist manchmal positiv, wo alle anderen Reaktionen versagen; es handelt sich da wohl um Mucinspuren (Schweissinger). Gegen Täuschungen durch Mucin soll man sich schützen können, wenn man eine Schicht-

<sup>1)</sup> W. J. Gies, Americ. Journ. of Physiol. 8. 15.

<sup>2)</sup> Tanret, Journ. de pharm. et de chimie [5] 28. 490; Chem. Zentralbl. 1894. 1. 112.

<sup>3)</sup> W. Henn, Zeitschr. f. Tiermed. 13. 212. 1910.

<sup>4)</sup> C. Zouchlos, Wiener allgem. med. Ztg. 1. 1890. 2; Zeitschr. f. analyt. Ch. 29. 380. — R. Schick, Prager med. Wochenschr. 1890. 306. — A. Ollendorff, Deutsche Medizinalztg. 1893. 77; Zeitschr. f. analyt. Ch. 33. 120.

<sup>5)</sup> P. Fürbringer, Deutsche med. Wochenschr. 27. 1885. 467; Zeitschr. f. analyt. Ch. 25. 285. — O. Mayer, Apoth.-Ztg. 1907. 477.



probe mit 2%iger Essigsäure als Kontrollprobe anstellt (Oppe). In Hunde- und Pferdeharn tritt auch normalerweise die Reaktion mit grosser Regelmässigkeit ein (Henn). Auch Albumose ist nachweisbar, Harnpepton dagegen nicht (Wöchnerinnenharn ohne Eiweiss, aber mit Biureprobe). Bei sehr dünnen Harnen (von 1,005 Dichte) versagt die Probe, tritt aber noch ein, wenn man den Harn vorher mit Kochsalzlösung vermischt. Jodhaltiger Harn gibt einen Niederschlag von Quecksilberjodid, ein Gehalt des Harns an Bromiden stört dagegen nicht. — Pollacci löst 1 g Weinsäure, 5 g Sublimat, 10 g NaCl in 100 ccm Wasser, setzt 5 ccm 40%iges Formaldehyd (Formol) zu und schichtet 2 ccm Reagens auf 3 bis 4 ccm Harn. Schärfe 1 : 370 000. Die Modifikation von Pollacci ist noch empfindlicher, wie die Spiegler'sche Reaktion, daher für klinische Zwecke zu empfindlich; sie zeigt nicht nur die Eiweiss- und Mucinspuren des normalen Harns an, sondern scheint auch nichteiweissartige Stoffe zu fällen (Lindsay u. Gies<sup>1)</sup>).

Jolles<sup>2)</sup> verwendet eine Lösung von 10 g Sublimat, 20 g Bernsteinsäure und 10 g Kochsalz in 500 ccm Wasser. Es werden 4—5 ccm Harn mit 1 ccm 30%iger Essigsäure und 4 ccm des Reagens geschüttelt, daneben 4—5 ccm Harn mit 1 ccm Essigsäure und 4 ccm Wasser. Die zweite Probe ergibt die Menge der mucinähnlichen Substanz und aus dem Vergleich dieser Probe mit der ersten erkennt man, ob der Harn Eiweiss enthält. Nach Jolles ist die Reaktion noch deutlich, wenn der Harn Eiweiss im Verhältnis von 1 : 120 000 enthält (was Graul bestätigt und ebenso Pollacci). — Man kann den Harn auch auf das Reagens schichten; die Probe ist dann so empfindlich wie die von Spiegler; bei jodhaltigen Harnen tritt ein Ring von Quecksilberjodid auf.

Rössler<sup>3)</sup> benutzt das von Jolles angegebene Reagens zu einer Schätzung der Eiweissmenge.

Amann<sup>4)</sup> löst 10 g HgCl<sub>2</sub>, 10 g Bernsteinsäure, 10 g Chlornatrium in 50 ccm Eisessig, 200 ccm Wasser, 250 ccm 90%igem Alkohol. Die Lösung wird mit Wasser zu 500 ccm ergänzt.

Alpers<sup>5)</sup> säuert den Harn mit HCl an und setzt das gleiche Volum 1%iger Quecksilbersuccinimidlösung hinzu. Bei Gegenwart von Eiweiss entstehen weisse Wolken. Empfindlichkeit 1 : 150 000.

β) Jodquecksilber-Kalium, Tanret's Reagens, auch von Bouchardat und Cardier empfohlen. Zur Herstellung desselben sollen 1,35 g Quecksilberchlorid unter Verwendung von möglichst wenig Wasser in 3,32 g Jodkalium (im Verhältnis von 1 Mol. HgCl<sub>2</sub> zu 4 Mol. KJ) gelöst, die Lösung mit 60 ccm Wasser verdünnt und darauf mit 20 ccm Eisessig versetzt werden. Da die entstehende Verbindung in überschüssiger Eiweisslösung löslich ist, aber nicht in überschüssigem Reagens, so setzt man das Reagens dem Harn tropfenweise bis zum Eintritt einer Trübung oder eines Niederschlages zu. Das Reagens fällt ausser Eiweiss (und der mucinähnlichen Substanz) auch Pepton und Alkaloide. Der Eiweissniederschlag ist gallertig, unlöslich in Essigsäure, Jodkalium, Alkohol, Äther. Der Peptonniederschlag löst sich beim Erwärmen. Um Eiweiss, Pepton und Alkaloide zu trennen, säuert man mit Schwefelsäure an und kocht mit einem Überschuss von Valserschem Reagens (einer mit Quecksilberjodid gesättigten 10%igen Jodkaliumlösung), wobei der Eiweissniederschlag ungelöst bleibt. Beim Erkalten

<sup>1)</sup> E. Spiegler, Wiener klin. Wochenschr. 1. 1892; Berichte d. chem. Gesellsch. 25. 375; Zentralbl. f. klin. Med. 14. 49. 1893; Wiener med. Blätter 38. 1894. Schweissinger, Münchener med. Wochenschr. 51. 1172. 1904. — Oppe, Ebenda (Diskussion). — W. Henn, l. c. 209. 211. — E. Pollacci, Bull. Chin. Farm. 40. 789. 1901. — Gordon Lindsay und Will. J. Gies, Amer. Med. 5. 175; Jahresber. f. Tierch. 33. 435. 1903.

<sup>2)</sup> A. Jolles, Zeitschr. f. physiol. Ch. 21. 306. 1895; Zeitschr. f. analyt. Ch. 39. 146. 1900. — G. Graul, Diss. Würzburg 1897.

<sup>3)</sup> Osk. Rössler, Deutsche med. Wochenschr. 29. 335. 1903.

<sup>4)</sup> Amann, Pharm. Zentralhalle 41. 557. 1900.

<sup>5)</sup> Wm. C. Alpers, Ebenda 39. 619. 1898.

des Filtrats fallen Pepton und Alkaloide aus. Schüttelt man die Probe mit Äther, so gehen die Alkaloide mit Jodkalium in Lösung; in der rückständigen wässrigen Lösung lässt sich dann das Pepton mit dem Jodquecksilberkalium nachweisen. Nach Brasse<sup>1)</sup> erzeugen Xanthin, Hypoxanthin, Allantoin, Kreatin, Kreatinin mit dem Reagens keinen Niederschlag; Méhu hatte angegeben, dass auch Guanin, Xanthin und Kreatinin durch das Reagens gefällt werden.

Nach Vallery<sup>2)</sup> wird das Eiweiss durch das Tanretsche Reagens vollständig gefällt. Es handelt sich um eine einfache Adsorptionsverbindung, welche durch Waschen mit siedendem Wasser und siedendem Alkohol wieder völlig zerlegt wird. Die Fällung des Eiweiss durch das Reagens ist keine augenblickliche. Die Menge des gefällten Eiweiss ist eine Funktion des in Lösung gebliebenen Jodquecksilberkalium.

Eine wässrige Lösung von Jodkaliumquecksilbercyanid kann nach Gouver<sup>3)</sup> ebenfalls als Eiweissreagens benutzt werden.

t) Jodwismutkalium ist nach Cohen<sup>4)</sup> für den Nachweis von Eiweiss im Harn empfindlicher als Kochsalz und Essigsäure, Ferrocyanwasserstoff, Pikrinsäure, Salpetersäure. Das Reagens muss in salzsaurer Lösung angewandt werden; da es beim Verdünnen mit Wasser einen Niederschlag von Jodwismut gibt, so müssen, um einem Irrtum zu entgehen, in seiner Anwendung auf den Harn die zu seiner Lösung erforderlichen Mengen Salzsäuren ermittelt werden (vgl. S. 312).

u) Ammoniummolybdat. Eiweiss, Peptone, Globuline geben mit Ammoniummolybdat bei saurer Reaktion einen Niederschlag. Der Eiweissniederschlag löst sich beim Erwärmen nicht, wohl aber der mit Peptonen und Globulinen entstehende.

Corzo<sup>5)</sup> benutzt eine Lösung von 1 g Ammoniummolybdat und 4 g Weinsäure in 40 ccm Wasser. Jaworowski hatte statt der Weinsäure die gleiche Menge Zitronensäure genommen. Das Reagens wird tropfenweise zu etwa 4 ccm Harn hinzugesetzt.

v) Eisenchlorid. Man säuert den zu prüfenden Harn mit Essigsäure an und schichtet eine Lösung von Eisenchlorid darüber. Bei Anwesenheit von Eiweiss entsteht ein weisslicher Ring (Haslam)<sup>6)</sup>.

w) Ammoniumpersulfat. Den zu prüfenden Harn schichtet man auf eine 10%ige Lösung des Persulfat. Es entsteht eine weissgraue trübe Zone. Empfindlichkeitsgrenze 1 : 100 000 (Strzyżowski<sup>7)</sup>).

x) Formol. Man erwärmt 4—5 ccm Harn bis fast zum Sieden, dann gibt man einige Tropfen Formaldehyd (40%ige Lösung) hinzu. Enthält der Harn Eiweiss, so sieht man nach einigen Sekunden klumpige, bräunlichweisse Massen, die sich bald zusammenballen und leicht abfiltrierbar sind. Der Harn muss frisch sein, da  $\text{NH}_3$  sich mit Formol umsetzt. Sehr eiweissreiche Harne geben mit Formol schon ohne Erwärmung Niederschläge (Trétrôp)<sup>8)</sup>.

<sup>1)</sup> Ch. Tanret, Zentralbl. f. d. med. Wissensch. 1877. 493; Zeitschr. f. analyt. Ch. 17. 525; Journ. de pharm. et de chimie [5] 28. 433 u. 490; Chem. Zentralbl. 1894. I. 109 u. 111. — Bouchardat und Cardier, Gaz. méd. de Paris 46. 1876. — L. Brasse, Compt. rend. de la Soc. de Biol. 1887. 369; Jahresber. f. Tierch. 1887. 187; Zeitschr. f. analyt. Ch. 28. 757.

<sup>2)</sup> L. Vallery, Compt. rend. de l'Acad. des sciences 153. 1243. 1911.

<sup>3)</sup> Gouver, Mercks Index 1902. 262.

<sup>4)</sup> A. Cohen, Nederl. Tijdschr. voor Geneesk. 1889. 2. 561; Jahresber. f. Tierch. 1888. 116.

<sup>5)</sup> Corzo, Apothekerztg. 1907. 6. — Jaworowski, Jahresber. f. Tierch. 22. 192. 1892.

<sup>6)</sup> Haslam, Zeitschr. f. analyt. Ch. 23. 115. 1884.

<sup>7)</sup> Cas. Strzyżowski, Schweiz. Wochenschr. f. Pharm. 36. 545. 1898.

<sup>8)</sup> Trétrôp, La Clinique 15. 403. 1901.

y) Alkoholfällung. Für besondere Zwecke hat man den Harn mit (3 bis 4 Vol.) Alkohol gefällt und mit dem Niederschlag Eiweissreaktionen angestellt (Farbenreaktionen usw.)

z) Anilinfarben (s. vorher Seite 1038). Violettschwarz. Man verwendetes in 0,2%iger Lösung. Man säuert den Harn mit 0,4%iger Essigsäure an, erwärmt und gibt bei einem vermuteten Eiweissgehalt von 1 : 1000—1 : 5000 auf 15 cem Harn 2—3 cem Reagens hinzu. Bei geringerem Eiweissgehalt ist das Reagens entsprechend zu verdünnen (Heidenhain)<sup>1)</sup>.

Über den Grad der Empfindlichkeit dieser Proben bei der Untersuchung von Harn sind von Lecorché und Talamon, von Vas, von Ott, von Pollacci, Henn u. a.<sup>2)</sup> vergleichende Bestimmungen angestellt worden. Danach ist die Probe von Spiegler, namentlich in der Modifikation von Pollacci (3. s. α) die empfindlichste, dieser folgen mit ungefähr gleichem Werte Trichloressigsäure (3. e), Sulfo-salicylsäure (3. f), die Phenolprobe von Millard (3. l), Molybdänsäure (3. n) und Tanrets Reagens (3. s. β); dann die Kochprobe (1), die Probe mit Ferrocyanwasserstoff (3. a) und die Hellersche Probe (2. a); danach die Probe mit Neutralsalz und Säuren (Roberts 2. b), die mit Rhodankalium und Essigsäure (3. c), Metaphosphorsäure (3. d) und Pikrinsäure (3. i); minder empfindlich sind die Proben mit Sublimat und Essigsäure (3. s. α), die von Jolles (3. q) und die von Rosenbach (3. o).

Verwechslungen mit anderen Substanzen als Eiweiss (Albumin und Globulin) werden am sichersten durch die minder empfindlichen Proben ausgeschlossen, und von diesen sind wieder die empfindlichsten die Kochprobe, die Hellersche Probe, die mit Ferrocyankalium und Essigsäure, mit Rhodankalium und Essigsäure und die mit Salicylsulfonsäure. Mittels der Spieglerschen Probe wird auch das normale Eiweiss nachgewiesen. Für den Nachweis pathologischer Eiweissmengen genügen die Kochprobe, die mit Ferrocyanwasserstoff und die Hellersche Probe vollständig.

Die Schwierigkeiten bestehen namentlich dann, wenn es sich um kleine Mengen von Albumin bzw. Globulin handelt, insbesondere wenn dieselben sich neben anderen Eiweisskörpern vorfinden, die diagnostisch eine andere Bedeutung haben.

Man soll sich in solchen Fällen nicht auf eine einzelne Reaktion verlassen. Man wird auskommen, wenn man die Kochprobe richtig ausführt (Kochen ohne vorherigen Säurezusatz, eventuell nach Verdünnen des Harns) und dieselbe durch die Probe mit Ferrocyankalium-Essigsäure und die Hellersche Probe kontrolliert. Die Probe mit Salicyl-

<sup>1)</sup> Martin Heidenhain, Münchener med. Wochenschr. 49. 437. 1902.

<sup>2)</sup> E. Lecorché und Ch. Talamon, Traité de albuminurie, Paris 1888, 35. — R. Vas, Ungarisches Archiv f. Med. 1. 118. 1893. — Ad. Ott, Deutsches Archiv f. klin. Med. 53. 604. 1894. — E. Pollacci, Jahresber. f. Tierch. 31. 401. — W. Henn, l. c. 212.



sulfonsäure, bei der namentlich die Verwendbarkeit in fester Form für die Praxis am Krankenbette eine Empfehlung ist, kann als Vorprobe dienen, bei deren negativem Ausfall abnorme Albuminurie auszuschliessen ist.

Die schärferen Proben sind für die Zwecke der Praxis zu scharf und können daher irre führen.

Bei einer Rundfrage nach einem speziell den militärärztlichen Bedürfnissen entsprechenden Reagens ergaben sich folgende Antworten. Nach Fr. Kraus kommt man für klinische Zwecke mit der Kochprobe, der Hellerschen Schichtprobe und der Essigsäure-Ferrocyankaliumprobe vollständig aus. Von den sog. trockenen Reagentien sind gepulverte Citronensäure und Ferrocyankaliumtabletten brauchbar. Die  $\beta$ -Naphthalinsulfosäuretabletten soll man nicht direkt verwenden, sondern erst nachdem man sie gelöst hat. Das Verhältnis 0,2 g Reagens zu 5 ccm Wasser braucht nicht streng eingehalten zu werden. Das Optimum der Reaktion liegt bei 3—6 % der Lösung, wenn das Verhältnis 1 Teil Lösung zu 5 Teilen Harn genommen wird. Ist die Naphthalinsulfosäure rein, so löst sie sich unter 6 % stets klar bei 15°. — Landgraf empfiehlt die Naphthalinsulfosäuretabletten als ein brauchbares und einwandfreies klinisches Reagens. Auch E. Fischer hält diese Säure für recht brauchbar; ebenso Strunk und Budde<sup>1)</sup>.

Salkowski<sup>2)</sup> empfiehlt zum Nachweis kleinster Eiweissmengen bei gleichzeitiger Gegenwart von sog. Mucin, wie es namentlich bei Scharlach in Betracht kommt, folgenden Weg: Man verdünnt den Harn bis zum spezifischen Gewicht 1007—1008, versetzt dann 100—200 ccm mit Essigsäure bis zur deutlich sauren Reaktion und lässt die trüb gewordene Flüssigkeit bis zum nächsten Tage stehen. Dann wird die klar gewordene Flüssigkeit abgehebert, abgegossen, eventuell auch abfiltriert. Fallen nun die oben erwähnten Proben negativ aus, so kann man einen solchen Harn als eiweissfrei bezeichnen.

4. Nachweis von Albumin als solchem. Man fällt aus Harn, der, wenn nötig, mit Alkalihydrat bis zur amphoteren oder sicherer bis zum Verschwinden der sauren Reaktion versetzt worden ist, das Globulin nach Hammarsten durch Sättigen desselben mit Magnesiumsulfat, fügt dem Filtrat reichlich Essigsäure zu und kocht. Ein dabei entstehender flockiger Niederschlag besteht aus Albumin (Hammarsten). Oder man macht nach Pohl<sup>3)</sup> den Harn mit Ammoniak schwach alkalisch, vermischt ihn mit seinem Volumen kalt gesättigter Ammonsulfatlösung und filtriert nach einstündigem Stehen. Tritt auf Zusatz von mehr Ammonsulfatlösung (bis mindestens zum 1,5 fachen Volumen des Harns) abermals ein Niederschlag auf, so kann das Albumin als nachgewiesen gelten. Doch ist in

<sup>1)</sup> Fr. Kraus, Landgraf, E. Fischer, Strunk und Budde, Veröffentlichungen a. d. Gebiete des Militärwesens. Heft 48. 1—61. 1911.

<sup>2)</sup> E. Salkowski, Char.-Ann. 30. 1906.

<sup>3)</sup> J. Pohl, Archiv f. exper. Pathol. 20. 426. 1886.

beiden Fällen eine Verwechslung mit Albumosen nicht ausgeschlossen (s. auch bei Globulin, sowie bei quantitativer Bestimmung).

Auch wird dabei nach Mörner<sup>1)</sup> ein kleiner Teil Albumin durch die im Harn vorhandenen eiweissfällenden Säuren mit abgeschieden, was jedoch für den qualitativen Nachweis des Albumins praktisch nicht in Betracht kommt.

Die Annahme, dass es sich bei der Albuminurie im wesentlichen um Übergang von Bluteiweisskörpern in den Harn handelt, ist durch die Untersuchung mit der „biologischen Reaktion“ bestätigt worden. Es hat sich aber gerade mit dieser Reaktion auch zeigen lassen, dass auch andere Eiweisskörper (Nahrungseiweiss) in den Harn übergehen können.

Das Blutserum von Kaninchen, die mit menschlichem Blutserum oder Nephritisharn vorbehandelt sind, enthält Präzipitine für menschlichen Eiweiss-harn bzw. menschliches Blutserum (Mertens, Zuelzer, Linossier und Lemoine, Dieudonné, Ascoli, Aschoff, Erben, Inouye, Leclainche und Vallée)<sup>2)</sup>.

Durch diese biologische Reaktion lässt sich auch differenzieren, ob der im Harn vorhandene Eiweisskörper dem Serumalbumin oder Serumglobulin oder einem Gemenge beider entspricht.

Zur Unterscheidung von Eialbumin von dem gewöhnlichen Harn-eiweiss (Serumalbumin) gibt Salkowski<sup>3)</sup> folgende Proben an:

1. Man versetzt den Harn mit so viel reiner  $\text{HNO}_3$  (1,2 D), ohne zu erhitzen, dass eine starke Trübung resp. Fällung eintritt, alsdann mit dem der Mischung gleichen Volumen Alkohol: Der natürliche Eiweiss-harn wird klar, der eialbuminhaltige trübt sich stärker, das Eiweiss oder ein Teil desselben scheidet sich in Flöckchen aus, welche die Flüssigkeit erfüllen. Bei längerem Stehen tritt oft stürmische Gasentwicklung ein, die die Flüssigkeit herausschleudert.

2. Man schüttelt den Harn mit dem gleichen Volum einer Mischung von 4 Vol. Äther und 1 Vol. Alkohol. Beim natürlichen Eiweiss-harn bleiben Harn und Äther ganz klar, nur an der Berührungsfläche findet sich meist ein leichtes Häutchen. Beim eiereiweiss-haltigen Harn entsteht ein dicklicher, mit Luftblasen vermischter Brei, aus dem sich der Äther nur langsam ausscheidet, zwischen dem Harn und dem Äther bleibt eine dickliche Zwischenschicht. Der Harn selbst erscheint trüb;

<sup>1)</sup> K. A. H. Mörner, Skandin. Archiv 6. 411.

<sup>2)</sup> Mertens, Deutsche med. Wochenschr. 161. 1901. — G. Zuelzer, Ebenda 219. — G. Linossier und G. H. Lemoine, Compt. rend. Soc. biol. 54. 276. 1902. — Dieudonné, Münchener med. Wochenschr. 533. 1901. — G. Ascoli, Ebenda 398. 1902. — L. Aschoff, The Lancet 1902. II. 651. — Fr. Erben, Zeitschr. f. klin. Med. 50. 457. 1904. — Inouye, Deutsches Archiv f. klin. Med. 75. 378. 1903. — E. Leclainche und H. Vallée, Compt. rend. Soc. biol. 53. 51. 1901.

<sup>3)</sup> E. Salkowski, Charité-Annalen 23. 4.

nach längerem Stehen (bis zum nächsten Tage) findet man eine Abscheidung von Eiweiss am Boden des Reagenzglases.

3. Man fällt aus 10 ccm Harn das Eiweiss durch 100 ccm Alkohol absol., filtriert nach  $\frac{1}{2}$  Stunde ab und übergiesst das abgeschabte Eiweiss in einem Probeglas mit Wasser: das natürliche Eiweiss löst sich vollkommen klar auf, das Eialbumin nicht oder doch nicht erheblich. Beim Erhitzen der Lösung des natürlichen Eiweiss mit Essigsäure und Zusatz von konzentrierter Kochsalzlösung scheidet sich das Eiweiss koaguliert aus. Vorausgesetzt ist, dass bei obigen Reaktionen der Gehalt des Harns an Eiereiweiss etwa 0,2% beträgt.

C. Abscheidung. Für manche Untersuchungen des Harns (z. B. zur polarimetrischen Zuckerbestimmung s. S. 419) ist es nötig, ihn vom Eiweiss (Albumin und Globulin) zu befreien, wenn er solches enthält. Es stehen dazu folgende Methoden zur Verfügung.

1. Das Albumin lässt sich zugleich mit dem Globulin bis auf sehr geringe, in gewissen Fällen für die weitere Untersuchung unwesentliche Bruchteile durch Kochen bei passend saurer Reaktion entfernen.

Reagiert der Harn von Haus aus stark sauer, so wird beim Kochen schon der grösste Teil des Eiweisses koaguliert; besitzt er eine nur schwach saure Reaktion oder ist er alkalisch, oder wird die vollständige Entfernung des Eiweisses beabsichtigt, so versetzt man den Harn, den alkalischen zuerst bis zum Verschwinden der alkalischen Reaktion, tropfenweise mit soviel Essigsäure, bis das Filtrat einer gekochten Probe auf Zusatz von Ferrocyankalium klar bleibt. Zur Koagulation taucht man das Reagenzglas mit der Probe in siedendes Wasser und kocht darnach noch auf. (S. auch bei quantitativer Bestimmung.)

2. Aus saurem Harn fällt das Eiweiss durch Zusatz von 3—4 Volumen starken Alkohols bis auf Spuren.

3. Das Albumin kann als solches zugleich mit dem Globulin durch Neutralsalze nach einer der S. 1086 angeführten Verfahrensweisen vollständig abgeschieden werden, als Acidalbumin aber durch Neutralsalze und einen reichlichen Überschuss an Säure, wie S. 1111 näher angegeben.

Salkowski hat zur Abscheidung von Eiweiss aus eiweisshaltigen Flüssigkeiten überhaupt folgendes Verfahren als zweckmässig gefunden. Die Flüssigkeit wird auf 100 ccm mit 20 g gepulvertem Kochsalz, darauf mit dem doppelten Volumen einer Mischung von 7 Volumen gesättigter Kochsalzlösung und 1 Volumen 30%iger Essigsäure versetzt, wiederholt stark geschüttelt und nach 15—20 Minuten filtriert. Das Filtrat ist völlig eiweissfrei. — Einfacher ist es, nach E. Ludwig<sup>1)</sup> den Harn auf 100 ccm mit 10—15 ccm gesättigter Kochsalzlösung zu versetzen, ihn mit einigen Tropfen Essigsäure deutlich anzusäuern und über freiem Feuer aufzukochen.

4. Albumin, Globulin und ein Teil der Albumosen (wenigstens, wie es scheint, die Heteroalbumose) lassen sich vollständig durch Fäll-

<sup>1)</sup> Salkowski, Zentralbl. f. d. med. Wissensch. 1880. 689. — E. Ludwig, Wiener med. Jahrb. 1884. 606.



mit einem Metallsalz (Eisenoxyd, Kupfer, Blei etc.) in völlig neutraler Lösung abscheiden.

a) Schnell, und in der Regel sicher führt die von Hoppe - Seyler angegebene Methode mit essigsaurem Eisenoxyd in der Modifikation von Schmidt - Mülheim und von F. Hofmeister zum Ziele. Nach Hofmeister wird dem Harn Natriumacetatlösung und darauf so viel konzentriertes Eisenchlorid zugesetzt, bis die Mischung eine blutrote Färbung angenommen hat. Die nun stark saure Flüssigkeit wird alsdann mit Alkalihydrat neutralisiert und aufgekocht. Nach dem Kochen reagiert die Flüssigkeit wieder sauer. Man setzt dann noch so viel Lauge hinzu, bis die Flüssigkeit gegen empfindliches Lackmuspapier amphoter reagiert (stärker sauer, als alkalisch), erhitzt zum Kochen und filtriert nach dem Erkalten. Ist die Fällung gelungen, so darf das Filtrat bei Zusatz von Essigsäure und Ferrocyankalium weder Reaktion auf Eiweiss noch auf Eisen geben. Der Zusatz von Acetat dient bloss zur Fällung eines etwa in Lösung bleibenden geringen Restes von Eisenoxydsalz als basisches Acetat, und bedarf es dazu auch nur einer geringen Menge von essigsaurem Natron. Spuren der Fällung entgehendes Eiweiss beseitigen Wassermann sowie Georges<sup>1)</sup> in der Weise, dass sie das Filtrat mit Essigsäure ansäuern, wenig Ferrocyankalium hinzufügen, nach mehrstündigem Stehen filtrieren, das überschüssige Ferrocyankalium mit essigsaurem Kupfer und den Überschuss von diesem mit Schwefelwasserstoff entfernen. — Auf zuckerhaltigen Harn ist das Verfahren nicht anwendbar, da dabei Eisenoxyd in Lösung bleibt. Auch bei zuckerfreiem Harn erhält man nicht immer Filtrate, welche mit Essigsäure und Ferrocyankalium keinen Niederschlag geben.

b) Der Methode a ganz ähnlich ist das von H. Ritthausen ursprünglich für die Fällung des Caseins aus der Milch angegebene, von J. Latschenberger und O. Schumann<sup>2)</sup> auf den Harn angewandte Verfahren. Es werden zu 1 Volumen Harn 2 Volumen kalt gesättigte Kupfervitriollösung und 2 Volumen Wasser hinzugefügt, die Mischung mit Natronlauge bis zur neutralen oder höchstens ganz schwach sauren Reaktion versetzt und nach einigem Stehen filtriert.

In beiden Fällen werden die Filtrate reicher an Salzen; dies wird vermieden nach der folgenden, gleichfalls von F. Hofmeister<sup>3)</sup> herrührenden Methode.

c) Ist der Harn reich an Albumin, so wird er zunächst nach C. 1. von der Hauptmasse des Eiweisses befreit, das Filtrat (mässig eiweisshaltiger Harn ohne Vorbereitung) mit essigsaurem Blei nahezu ausgefällt, filtriert und das Filtrat mit Bleihydrat einige Minuten im Kochen erhalten, wieder filtriert und die gewonnene Flüssigkeit mit Schwefelwasserstoff vom gelösten Blei befreit. Sie enthält von den zugesetzten Reagentien nur noch Essigsäure, die sich nötigenfalls durch Abdampfen entfernen lässt. Das Ausfällen des Harns mit essigsaurem Blei vor dem Kochen desselben mit Bleioxyd ist darum nötig, weil der Harn beim Kochen mit Bleihydrat direkt stark alkalische Reaktion annimmt und unter diesen Umständen noch Eiweiss in Lösung bleibt.

d) Nach Kowalewsky<sup>4)</sup> lässt sich das Eiweiss (aus serösen Flüssigkeiten) vollständig durch die gerade erforderliche Menge oder einen Überschuss von essigsaurem Uran fällen. Der Niederschlag löst sich etwas in Wasser, ferner in Mineralsäuren und organischen Säuren, leicht und vollständig in 2%iger Essigsäure.

e) Alle diese Methoden werden in der Einfachheit der Ausführung und der Sicherheit des Resultates durch die von Devoto<sup>5)</sup> übertroffen. Man sättigt

<sup>1)</sup> Schmidt - Mülheim, Du Bois' Archiv f. Physiol. 1880. 33. — F. Hofmeister, Zeitschr. f. physiol. Ch. 4. 263. — M. Wassermann, De la peptonurie etc. Thèse. Paris 1885. 52. — Georges, Journ. de pharm. et de chimie [5] 14. 353; Zeitschr. f. analyt. Ch. 26. 668. 1887.

<sup>2)</sup> H. Ritthausen, Journ. f. prakt. Ch. 15. 329. 1877; Zeitschr. f. analyt. Ch. 17. 241. — J. Latschenberger und O. Schumann, Zeitschr. f. physiol. Ch. 3. 161. 1879.

<sup>3)</sup> F. Hofmeister, Zeitschr. f. physiol. Ch. 2. 288. u. a. a. O.

<sup>4)</sup> N. Kowalewsky, Zeitschr. f. analyt. Ch. 24. 551. 1885.

<sup>5)</sup> L. Devoto, Zeitschr. f. physiol. Ch. 15. 465. 1891.

den Harn mit Ammoniumsulfat, indem man in demselben auf 100 ccm 75 g von dem feingepulverten Salz in gelinder Wärme unter fleissigem Rühren zur Lösung bringt und lässt die Flüssigkeit noch 30—40 Minuten in einem Dampftopf verweilen. Albumin und Globulin werden dabei unabhängig von der ursprünglichen Reaktion des Harns koaguliert, während Albumosen zwar auch gefällt werden, beim Auswaschen des salzreichen Niederschlages aber wieder in Lösung gehen.

f) Bei der Fällung des Harns mit Mercurinitrat nach Patein und Dufan (s. S. 1207) werden auch die Eiweisskörper, sowie die Albumosen wie Peptone entfernt. — Auch bei der Behandlung des Harns mit Bleiacetat (S. 1207) wird das Eiweiss mit gefällt.

5. Von den spezifischen Eiweissreagentien ist das Kaliumwismutjodid von Brücke, das Aseptol von Riegler zum Enteiweissen des Harns empfohlen worden. Phosphorwolframsäure schlägt alle Eiweisssubstanzen, mit Einschluss des Peptons, aus saurer Lösung nieder.

Vom Aseptol soll man 2—3 ccm zu 20 ccm Harn setzen. — Der Harn, welcher mit Phosphorwolframsäure ausgefällt werden soll, ist mit 0,1 Vol. Salzsäure zu versetzen; wird er bei der Fällung sehr verdünnt, so hat man sich zu überzeugen, dass auf nachträglichen Zusatz von Salzsäure kein Niederschlag mehr entsteht. Bei Gegenwart von Zucker wird das Filtrat blau.

6. Zur Enteiweissung des Harns zur nachfolgenden Untersuchung auf Albumosen bedienten sich Morawitz und Dietschy<sup>1)</sup> folgenden Verfahrens: 500 ccm mit saurem phosphorsaurem Kalium schwach angesäuerter Harn werden mit dem doppelten Volum 96%igem Alkohol im Wasserbad 5—6 Stunden bei einer Temperatur von 50—60° erhitzt. Nach dem Erkalten wird filtriert, das Filtrat bei 50—60° auf etwa 300 ccm eingeeengt, dann nach Hinzufügen von wenig verdünnter Schwefelsäure (2 ccm auf 100 ccm Harn) mit Zinksulfat in Substanz gesättigt. Hierbei werden der Koagulation entgangene Globulinreste, sowie auch etwaige Reste anderer fällbarer Eiweisskörper entfernt. Der durch Zinksulfat erzeugte Niederschlag enthält auch eventuell vorhandene Albumosen, die aber nicht koaguliert, sondern nur niedergeschlagen sind. (Siehe bei Albumosen.)

7. Die Verfahren von Michaelis und Rona mittels Mastix<sup>2)</sup>, Kaolin<sup>3)</sup>, kolloidalem Eisenhydroxyd<sup>4)</sup> sind für den Harn für manche Zwecke wohl anwendbar.

Rona<sup>5)</sup> versetzt Harn mit  $\frac{1}{10}$  Vol. von kolloidalem Eisenhydroxyd (Liquor ferri oxydati dialysat. — Der Liquor ferri oxychlorati Pharm. Germ. ist erst, nachdem man bis zur Chlorfreiheit dialysiert hat, anwendbar) und bekam so eiweissfreie, gut polarisierbare Filtrate.

<sup>1)</sup> Morawitz und Dietschy, Archiv f. exper. Pathol. u. Pharm. 54. 88. 1906.

<sup>2)</sup> L. Michaelis und P. Rona, Biochem. Zeitschr. 2. 219. 1907; 5. 365. 1907; 3. 109. 1907; 4. 11. 1907.

<sup>3)</sup> L. Michaelis u. P. Rona, Biochem. Zeitschr. 7. 329. 1908; 8. 356. 1908.

<sup>4)</sup> L. Michaelis u. P. Rona, Biochem. Zeitschr. 7. 329; 14. 476. 1908. — B. Oppler und P. Rona, Ebenda 13. 121. 1908.

<sup>5)</sup> Briefliche Mitteilung an Verf.

## D. Quantitative Bestimmung.

## I. Bestimmung des Gesamteiweisses.

## 1. Durch Koagulation bei geeignet saurer Reaktion und Wägen.

## A. Nach Scherer-Huppert.

A. Prinzip. Es wird ein bestimmtes Volumen Harn, welchem der für die vollständige Koagulation des Eiweisses geeignete Grad der sauren Reaktion erteilt worden ist, zum Sieden erhitzt, das Koagulum auf einem trockenen und gewogenen Filter gesammelt, ausgewaschen, getrocknet und mit dem Filter wieder gewogen. Die Gewichtszunahme des Filters ergibt die Menge des Eiweisses, welches aus dem in Arbeit genommenen Volumen Harn abgeschieden wurde.

B. Ausführung. Man hat den Harn, wenn er trüb ist nach dem Filtrieren, mit so viel Essigsäure zu versetzen, dass das Filtrat einer gekochten Probe mit Essigsäure und Ferrocyankalium keinen Niederschlag mehr gibt. Man nimmt (für 2 Bestimmungen) 0,5—1 Liter in Arbeit und versetzt ihn, wenn er nicht schon sauer reagiert, tropfenweise bis zum völligen Verschwinden der alkalischen Reaktion mit starker (30 oder 50%iger) Essigsäure. Kleine Volumina Harn verdünnt man vor der Koagulation mit Wasser. Jetzt nimmt man die erste Reaktion vor. Man stellt dazu ein Reagenzglas mit einigen Kubikzentimetern Harn in siedendes Wasser, verschliesst das Glas, wenn die Koagulation eingetreten ist, und schüttelt auf. Beim Einfüllen der Probe in das Reagenzglas lässt sich ein Benetzen der oberen Wand nur schwer vermeiden; unterlässt man das Aufschütteln, so kann es geschehen, dass beim nachfolgenden Filtrieren Harn mit unkoaguliertem Eiweiss mit in das Filtrat gelangt, und man setzt sich so der Gefahr aus, Eiweiss im Filtrate zu finden, auch wenn der erhitzte Teil keines mehr gelöst enthält. Dann kocht man die Probe über freier Flamme, filtriert, nötigenfalls durch mehrmaliges Aufgiessen des Filtrats auf dasselbe Filter, und prüft das klare Filtrat in angegebener Weise. Ist, wie in der Regel, noch Eiweiss vorhanden, so versetzt man den Harn noch mit 1—2 Tropfen Essigsäure und stellt eine neue Probe an. Den weiteren Zusatz der Essigsäure bemisst man nach dem Grade, in welchem das Eiweiss im Filtrate abnimmt. Vermindert es sich nicht merklich, so setzt man dem Harn nicht nur einen Tropfen Essigsäure hinzu, sondern gleich mehrere, 3 bis 5, auf einmal. Nur gegen das Ende muss man mit dem Essigsäurezusatz vorsichtig sein. Übersäuert wird der Harn, wenn man nach dieser Vorschrift verfährt, nicht leicht. Die Verdünnung, welche der Harn durch den Zusatz von Essigsäure erfährt, ist eine so minimale, dass sie vernachlässigt werden kann; für 1 Liter



von Haus aus sauren Harn können 24—28 Tropfen 50%iger Essigsäure genügen.

Zur Koagulation misst man von dem Harn soviel in ein Becherglas ab, dass der Eiweissniederschlag womöglich nicht mehr als 0,2 bis 0,5 g beträgt, von eiweissarmen Harnen also 100 ccm, von eiweissreicheren entsprechend weniger. Nach einiger Erfahrung lernt man leicht den Eiweissgehalt eines Harns nach der im Reagenzglas vorgenommenen Probe annähernd schätzen. Man erhitzt dann den Harn erst in siedendem Wasser, bis sich Flocken abgeschieden haben, und kocht noch einmal vorsichtig, so dass die Flüssigkeit nicht überläuft, über freier Flamme auf. Es wird dann zuerst die Flüssigkeit durch ein bei 110—120° getrocknetes und nach dem Erkalten im Exsikkator gewogenes Filter aus aschefreiem Papier abgegossen, darauf der Niederschlag vollständig auf das Filter gebracht, mit heissem Wasser chlorfrei und dann noch mit Alkohol und mit Äther gewaschen. Zum Abreiben des an der Glaswand haftenden Eiweisses bedient man sich eines Glasstabs, über dessen Spitze ein kurzer Kautschukschlauch gezogen ist. Man tut gut, den Niederschlag in einem Zuge auf das Filter zu bringen, weil bei längerer Unterbrechung der Filtration die über der Flüssigkeit befindlichen Teile des Koagulums so fest auf der Glaswand austrocknen, dass man grosse Mühe hat, sie wieder vollständig abzulösen. Nach vollständigem Auswaschen trocknet man das Filter wieder bei 110 bis 120° bis zur Gewichtskonstanz und wägt nach dem Erkalten abermals.

Für genaue Bestimmungen muss das Koagulum noch mit Alkohol und mit Äther von Fett befreit und der Aschegehalt des getrockneten Niederschlags bestimmt werden. Die Asche ist vom Gewicht der Trockensubstanz in Abzug zu bringen. Man nimmt das Veraschen in einem Platintiegel vor, den man, um das Übersäumen des beim Erhitzen stark aufquellenden Gerinnsels zu verhindern, anfangs nicht am Boden, sondern an der Wand erhitzt.

Bei guten Doppelbestimmungen brauchen die Resultate nicht mehr als um 1% des Eiweisses voneinander abzuweichen.

1. Die ältere, noch häufig gegebene und befolgte Vorschrift, ein abgemessenes Volumen Harn zum Kochen zu erhitzen und so lang mit verdünnter (2 %-iger) Essigsäure zu versetzen, bis die Eiweissflocken scharf abgegrenzt und die Flüssigkeit zwischen den Flocken wasserklar ist, führt nicht zu genauen Resultaten. Die Eiweissmengen aus zwei so hergerichteten Proben stimmen nicht gut überein, und in den Filtraten ist in der Regel noch Eiweiss nachweisbar.

2. Es ist zweckmässig, das Filter sowohl leer wie mit dem Niederschlag in einem Glaswolltrichter zu trocknen. Das leere Filter nimmt so in einigen Stunden, das Filter mit dem Niederschlag, wenn dieser nicht übertrieben gross ist, schon in 24—30 Stunden konstantes Gewicht an, während das Trocknen des Niederschlags im Trockengläschen bis zu diesem Punkte ununterbrochen mindestens 8 Tage erfordert und das Papier dabei braun wird, also jedenfalls sein ursprüngliches Gewicht nicht behält. Verascht wird der Niederschlag mit dem Filter.

Durch das Waschen des Koagulums mit Alkohol und mit Äther entfernt man nicht bloss in dem Niederschlag etwa enthaltenes Fett und andere in diesen Lösungsmitteln lösliche Substanzen, sondern erreicht auch, dass sich der Niederschlag beim Trocknen nicht, wie der nur mit Wasser gewaschene, in eine hornartige Masse verwandelt, sondern locker bleibt, wodurch das Trocknen des Niederschlags sehr beschleunigt wird; überdem färbt sich auch ein so behandelter Niederschlag beim Trocknen weniger dunkel.

Bei vergleichenden Bestimmungen muss man die Niederschläge immer bei derselben Temperatur trocknen, weil bei relativ niedriger Temperatur getrocknete Niederschläge in höherer Temperatur wieder Wasser abgeben, also leichter werden. Trocknet man ein und denselben Niederschlag bei verschiedenen Temperaturen, so ist es schwer, Gewichtskonstanz zu erlangen.

3. Um das zeitraubende Trocknen und wiederholte Wägen des Koagulums zu ersparen, sind verschiedene Vorschläge gemacht worden.

a) Nahe liegt der Gedanke, in dem ausgewaschenen Gerinnsel den Stickstoff nach Kjeldahl (s. dort) zu bestimmen und aus dem gefundenen Ammoniak oder Stickstoff die Eiweissmenge zu berechnen. Sebelien<sup>1)</sup> hat sich dieses Verfahrens in ausgedehntem Masse bedient. Die Genauigkeit der Bestimmung hängt aber u. a. davon ab, welchen Stickstoffgehalt man dem Eiweiss zuschreibt. Starke fand im Serumalbumin (des Menschen) 15,88 % Stickstoff, Hammarsten im Serumglobulin 15,85 %. Danach erhält man die Eiweissmenge, wenn man das Gewicht des gefundenen Stickstoffs mit 6,3 multipliziert.

b) Bornhardt bestimmt das Gewicht des ausgewaschenen Niederschlags mittels des Pyknometers. Das Verfahren setzt die Kenntnis der Dichte des koagulierten Eiweisses voraus; sie beträgt nach Bornhardt 1,314; danach würde 1 cem Eiweiss 1,314 g wiegen, also  $1,314 - 1,0 = 0,314$  g mehr, als 1 cem Wasser. Ein mit Eiweiss und Wasser gefülltes Pyknometer wiegt demnach mehr als ein bloss mit Wasser gefülltes. Die Gewichtszunahme des Pyknometers, dividiert durch 0,314, gibt die Anzahl Kubikzentimeter Eiweiss, welche in dem Pyknometer enthalten sind; da nun aber 1 cem Eiweiss 1,314 g wiegt, so erfährt man das Gewicht des Eiweisses, wenn man die Kubikzentimeter Eiweiss (den vorher erhaltenen Quotienten) mit 1,314 multipliziert. Bezeichnet man die Gewichts-differenz zwischen dem Eiweiss und Wasser sowie dem bloss Wasser enthaltenden Pyknometer mit D, so erhält man also das Gewicht des vorhandenen Eiweisses nach  $\frac{1,314 D}{0,314} = 4,1847 D$ . Nach Stolnikoff<sup>2)</sup> ergab die Bestimmung des Eiweisses nach diesem Verfahren so geringe Unterschiede gegenüber den Wägungen, dass die Methode für klinische Zwecke brauchbar erscheint.

Bei dieser Bestimmung wird das Eiweiss ebenso koaguliert, wie für die direkte Wägung, aber das Koagulum darf nur mit heissem Wasser gewaschen werden; nach dem Waschen spritzt man das Eiweiss in ein Pyknometer, das einen weiten, nicht eingeschnürten Hals mit Marke haben muss und mit einem Glasstopfen verschlossen werden kann. Das Wasser, mit welchem das Pyknometer gewogen wird, sowie Eiweiss und Wasser, sollen bei den beiden Wägungen die gleiche Temperatur (20°) haben.

Ob diese Abänderungen bei der Leichtigkeit, mit welcher man die Eiweissniederschläge nach (2) trocken erhalten kann, bequemer sind als die Wägungsbestimmung und wesentlich Zeit sparen, ist doch wohl sehr zweifelhaft. Jedenfalls hängt aber die Dichte des Eiweisses und damit die Menge des nach diesem Verfahren bestimmten Eiweisses, wie bei der Bestimmung durch Wägen, von der Temperaturhöhe, bei welchem der Niederschlag getrocknet wird, und von der Dauer des Trocknens ab. C. Schmidt gibt die Dichte des in Lösung befindlichen

<sup>1)</sup> Sebelien, Ztschr. f. physiol. Ch. 13. 135. 1889.

<sup>2)</sup> A. Bornhardt, Archiv f. klin. Med. 16. 222; Ztschr. f. analyt. Ch. 16. 124. — J. Stolnikoff, Petersburger med. Wochenschr. 6. 1876.

Eiweisses zu 1,2746 an, aus den Bestimmungen von Lohnstein ergibt sie sich zu 1,278 und Huppert und Záhor<sup>1)</sup> fanden sie im Mittel von 20 Bestimmungen zu 1,3747 (1,352—1,405).

4. Bernard<sup>2)</sup> empfiehlt bei einem ikterischen, harnsäurereichen Harn zuerst durch Versetzen mit Salzsäure und 24 stündiges Stehenlassen die Harnsäure vollständig auszufällen, alsdann die alkalisch gemachte Lösung mit Essigsäure wieder anzusäuern und nun erst das Eiweiss nach der bekannten Methode zu bestimmen.

#### B. Nach Devoto<sup>3)</sup>.

In sauer reagierendem Harn wird in der Wärme auf 100 ccm 75 g Ammonsulfat aufgelöst und die Auflösung noch 30—40 Minuten in einem Dampftopf erhitzt. Man filtriert durch ein getrocknetes und gewogenes Filter, wäscht aus, trocknet und wägt; vom Trockengewicht wird die Asche abgezogen.

Das Verfahren hat vor dem von Scherer den Vorzug, dass das Eiweiss aus seinen Lösungen bei jedweder Reaktion vollständig abgeschieden wird; sauer soll der Harn sein, weil er dann die Phosphate in Lösung enthält. Während das Verfahren bei natürlichen Eiweisslösungen vorzüglich ist, besteht bei Harn die Gefahr, dass Harnsäure als Ammonurat mit ausfällt. Redelius<sup>4)</sup> erhielt aus eiweissfreien Harnen von 1,019—1,035 Dichte auf 100 ccm 0,0034—0,0275 g organische Substanz, aus Harnen von 1,0355—1,060 Dichte 0,073—0,1105; wenn der Niederschlag mit heissem Wasser noch einige Zeit nach dem Verschwinden der Schwefelsäurereaktion weiter ausgewaschen wird, kann die Menge der organischen Substanz noch vermindert werden. Vergleichende Bestimmungen nach Scherer und nach Devoto ergaben bei Devoto eine absolute Vermehrung von 0,013—0,077%. Der absolute Fehler bei Devoto ist also gering und in gewöhnlichen Fällen ohne Belang, kann aber bei eiweissarmen und konzentrierten Harnen erheblich werden.

#### C. Nach Jolles.

Nach Jolles<sup>5)</sup> versetzt man 100 ccm des gegebenenfalls mit Essigsäure neutralisierten Harns mit 5 ccm einer Mischung von 50 ccm 1 %iger Essigsäure, 50 ccm käufliches Formol und 15 g NaCl und erhitzt  $\frac{1}{2}$  Stunde im kochenden Wasserbad, bis sich die über dem Niederschlag stehende Flüssigkeit geklärt hat. Der Niederschlag wird auf ein gewogenes Filter gebracht, mit heissem Wasser,

<sup>1)</sup> C. Schmidt, Charakteristik der epidemischen Cholera, Leipzig und Mitau 1850. 26. — Th. Lohnstein, Pflügers Archiv **59**. 498. 1895. — Huppert und Záhor, Ztschr. f. physiol. Ch. **12**. 472. 1888.

<sup>2)</sup> M. Bernard, Pharm. Ztg. **4**. 286. 1902.

<sup>3)</sup> L. Devoto, Ztschr. f. physiol. Ch. **15**. 474. 1891.

<sup>4)</sup> H. Redelius, Upsala Läkareförenings Forh. **27**; Jahresb. 1892. 241.

<sup>5)</sup> A. Jolles, Ber. deutsch. pharm. Gesellsch. **18**. 598. 1909.



Alkohol, Äther gewaschen, bei  $110^{\circ}$  getrocknet und gewogen. Die Asche wird vom Eiweissgewicht in Abzug gebracht.

### D. Nach Bellocq<sup>1)</sup>.

100 cem filtrierter Harn werden mit 1 g Calciumacetat und mit Ammoniak bis zur alkalischen Reaktion versetzt und so lange gekocht, bis der leichte Schaum beim Entfernen der Flamme sofort verschwindet. Man filtriert den Niederschlag von Eiweiss, Phosphat, Urat und Oxalat ab, spritzt in ein Glas und setzt 3 cem  $\text{HNO}_3$  zu, wobei die Salze gelöst bzw. zersetzt werden. Ist nach  $\frac{1}{2}$  Stunde die von Uraten herrührende Rötung verschwunden, so versetzt man mit Alkohol, wäscht den Niederschlag mit angesäuertem Alkohol aus, trocknet und wägt.

## 2. Andere Fällungsmethoden.

A. Lecerf<sup>2)</sup> fällt das Eiweiss aus 50 cem Harn durch Kochen mit Natriumsulfat und Essigsäure (S. 1111), bestimmt in dem ausgewaschenen Niederschlag den Stickstoff nach Kjeldahl und berechnet das Eiweiss durch Multiplikation des Gewichts Stickstoff mit 6,24. — Der Niederschlag besteht aus Acidalbumin und geht beim Wegwaschen des Salzes wieder teilweise in Lösung. Der richtige Faktor, mit welchem zu multiplizieren wäre, ist 6,3 (S. 1129).

B. Girgensohn versetzt eine bestimmte Quantität Harn mit dem halben Volumen einer 20%-igen Kochsalzlösung und fügt darauf so viel Tanninlösung hinzu, als zur vollständigen Fällung des Eiweisses erforderlich ist. Man soll dann den Niederschlag auf einem gewogenen Filter erst mit destilliertem Wasser bis zum Verschwinden der Chlorreaktion und sodann mit kochendem Alkohol so lange waschen, bis sich in dem Filtrat kein Tannin mehr nachweisen lässt. Der Rückstand soll getrocknet und gewogen werden. In der vorliegenden Form ist das Verfahren für die Eiweissbestimmung schon darum nicht geeignet, weil nach Sebelien<sup>3)</sup> aus Lösungen von reinem Albumin Tannin zwar alles Albumin fällt, beim Auswaschen der Niederschläge mit Alkohol aber wieder stickstoffhaltige Substanz in Lösung geht. Nach Sebelien fällt man mit Almén'scher Tanninlösung (S. 1116). in der Kälte und wäscht mit kaltem Wasser aus. Die Wägung des Niederschlags ist untunlich, weil der Niederschlag das Tannin in wechselnder Menge enthält. Aus dem nach Kjeldahl ermittelten Stickstoffgehalt des Niederschlags lässt sich die Eiweissmenge mit dem Faktor 6,3 berechnen, wenn man sicher ist, dass der Niederschlag ausser Eiweiss keine andere stickstoffhaltige Substanz (Harnsäure u. a.) enthält.

C. Nach Méhu setzt man zu 100 cem Harn, die nicht mehr als 0,2—0,4 g Eiweiss enthalten dürfen, 2 cem Salpetersäure und darauf 10 cem einer Mischung von gleichen Teilen krystallisiertem Phenol und Eisessig mit zwei Teilen Alkohol von 90%. Man filtriert, wäscht zuerst mit Wasser, dem  $\frac{1}{2}$ % Phenol zugesetzt ist, später mit alkoholhaltigem Wasser aus, trocknet bei  $110^{\circ}\text{C}$ , wägt und verascht. Das Phenol lässt sich aus dem Niederschlag wieder vollständig auswaschen (Boillat), die Trockensubstanz ist bloss Eiweiss. Méhu fand unter der Annahme, dass alles Organische Eiweiss sei, durchschnittlich 93% des Eiweisses wieder. — Prüfungen von Schacht ergaben, dass die Méhusche Methode, namentlich bei Harnen mit geringem Eiweissgehalt, gegenüber der Bestimmung nach Scherer-Huppert keinerlei Vorzüge hat. — Nach Reuss bilden sich (in serösen Flüssigkeiten) zwar schöne Flocken, die sich leicht abfiltrieren lassen, aber beim Auswaschen zu

<sup>1)</sup> H. Bellocq, *Annal. chim. analyt. appliq.* **9**. 384. 1904.

<sup>2)</sup> Ch. Lecerf, *Chem. Centralbl.* 1888. 503; *Ztschr. f. analyt. Ch.* **28**. 134.

<sup>3)</sup> Girgensohn, *Arch. f. klin. Med.* **11**. 613. — Sebelien, *Ztschr. f. physiol. Ch.* **13**. 143. 1889.

einer Gallerte aufquellen, welche zum Teil mit filtriert. — Nach Ruizand<sup>1)</sup> hat man beim Auswaschen mit Phenollösung um so grössere Verluste je konzentrierter die Phenollösung ist; bei Verwendung einer 3—4 %-igen wässrigen Phenollösung verliert man jedoch nur Spuren Eiweiss und der Niederschlag wird auch nicht schleimig.

D. Esbach versetzt 20 cem Harn mit ebensoviel seiner Pikrinsäurelösung (s. S. 1116), erwärmt die Mischung im Wasserbad, filtriert, wäscht aus, trocknet und wägt; von dem Niederschlag werden 80% als Eiweiss gerechnet.

E. Nach Obermayer<sup>2)</sup> fällt man mit überschüssiger Trichloressigsäure, wäscht den Niederschlag mit saurehaltigem Wasser aus und unterwirft ihn einer sorgfältigen Extraktion mit Alkohol und mit Äther.

F. Nach Liborius versetzt man 50—100 cem Harn in einem Becherglase mit dem 4—5 fachen Volumen Alkohol von 85 %. Nach 24 Stunden sammelt man den grobflockigen Niederschlag auf einem Filter, wäscht aus, trocknet bei 110—115° und wägt. Vom Trockengewicht ist noch die nicht unbedeutende Aschenmenge abzuziehen. — Wassiljew<sup>3)</sup> erwärmt den Harn mit 4—5 Vol. Alkohol 10 Minuten in heissem Wasser, filtriert heiss und wäscht den Niederschlag mit Alkohol; der Aschegehalt desselben beträgt nicht mehr als 1 %. — Liborius erhielt nach seinem Verfahren stets mehr Eiweiss, als nach dem von Scherer oder mit dem von Scherer im Wesen gleichen von Berzelius, offenbar, weil Eiweiss nicht die einzige organische Substanz ist, welche durch Alkohol aus dem Harn niedergeschlagen wird.

### 3. Indirekte Bestimmungsweisen.

Das Bedürfnis der Ärzte hat das Verlangen nach Methoden hervorgerufen, nach welchen sich das Eiweiss, wenn auch nicht so genau wie durch Wägen, doch schneller, mit weniger Hilfsmitteln und mit geringeren Ansprüchen an die technische Fertigkeit des Analytikers bestimmen lässt. Von den in Vorschlag gebrachten Methoden kommt die densimetrische in der Genauigkeit der Wägungsmethode am nächsten; sie erfordert aber sorgfältige Arbeit und braucht mehr Zeit, als eine der übrigen indirekten Methoden. Von den anderen geben die optische Methode von Christensen und das Verfahren von Roberts-Stolnikoff (Brandberg) Resultate von ungefähr gleichem Werte, beide sind aber noch weniger genau als die densimetrische Methode. Das Verfahren von Esbach ist zu Bestimmungen der absoluten Eiweissmenge überhaupt nicht zu brauchen, zu der der relativen Mengen aber auch nur dann, wenn es unter gleichbleibenden Bedingungen ausgeführt wird. Die Bestimmung aus der Abnahme des Stickstoffgehalts des

<sup>1)</sup> Méhu, Arch. gén. de méd., März 1869; Journ. de pharm. et de chim. 1869. 95; Ztschr. f. analyt. Ch. 8. 522. — Boillat, Journ. f. prakt. Ch. [2] 25. 305. 1882. — Schacht, Arch. d. Pharm. 139. 19. — A. Reuss, Arch. f. klin. Med. 24. 584. 1879. — A. Ruizand, Journ. de pharm. et de chimie [5] 29. 364; Chem. Zentralbl. 1894. 1. 1100.

<sup>2)</sup> Fr. Obermayer, Wiener med. Jahrbücher 1888. 375; Jahresb. f. Tierch. 29. 7. 1889.

<sup>3)</sup> P. Liborius, Arch. f. klin. Med. 10. 319. 1874. — N. Wassiljew, St. Petersburger med. Wochenschr. 37. 1896; Jahresb. f. Tierch. 1897. 376.

Harns durch die Koagulation scheint brauchbar zu sein. Von den neuerdings empfohlenen Absatzmethoden scheint die von Tsuchiya klinisch am besten brauchbar zu sein. Wirklich exakte Werte liefern aber nur die gewichtsanalytischen direkten Bestimmungen. Bei grösserer Übung kann auch aus der Intensität der qualitativen Proben (Kochprobe, Heller, Ferrocyanwasserstoff) einigermaßen die Menge des Eiweiss erschlossen werden.

#### A. Die densimetrische Methode.

A. Prinzip. Bestimmt man die Dichteabnahme, welche der Harn bei der Entfernung des Eiweisses aus ihm durch Koagulation (S. 1127) erleidet, so erfährt man, wieviel Gramm Eiweiss der Harn in 100 ccm enthalten hat, wenn man die Dichteabnahme mit 400 (Záhorscher Faktor) multipliziert.

Lang ist zuerst auf den Gedanken gekommen, es werde sich das Eiweiss des Harns aus der Dichteverminderung berechnen lassen, welche der Harn bei der Koagulation erfährt; der gefällten Eiweissmenge werde eine bestimmte Dichteverminderung entsprechen und mit dieser Verhältniszahl als Faktor sei dann der Dichteunterschied zu multiplizieren, um das Gewicht des Eiweisses zu erfahren. Lang, sowie Haebler und Bornhardt, welche die Angaben von Lang einer Prüfung unterzogen, nahmen den Faktor als konstant an. Budde wies aber aus der Theorie des Vorgangs nach, dass der Faktor von den Dichten der Flüssigkeit vor und nach der Entfernung des Eiweisses abhängig, also mit diesen Grössen variabel sei, was von Huppert und Záhör durch den Versuch bestätigt wurde. Huppert hat dann aus diesen Beobachtungen empirische Faktoren entwickelt, in welchen dem Einfluß der Anfangs- und der Enddichte Rechnung getragen wird. Spätere Untersuchungen von Záhör<sup>1)</sup> ergaben aber, dass für Harn, da bei dem geringen Eiweissgehalt des Harns die beiden Dichten nicht soweit auseinanderliegen, wie bei anderen konzentrierteren Eiweisslösungen, recht wohl ein konstanter Faktor anwendbar ist.

Aus den Beobachtungen von Lang berechnet sich der Faktor zu 367, Haebler hat ihn zu 210 gefunden, aus den Bestimmungen von Bornhardt ergibt er sich zu 435, aus denen von Budde im Mittel zu 421. Záhör nimmt ihn zu 400, Lohnstein<sup>2)</sup> zu 360 an. Die Unterschiede in der Grösse des Faktors sind, abgesehen von dem Haeblers, begründet in dem Grad der Genauigkeit, mit welcher die Dichteabnahme und die Eiweissmenge bestimmt und bei welcher Temperatur das Eiweiss getrocknet wurde. In den Beobachtungen von Záhör wurden die Dichten mit den Sprengelschen Pyknometer ermittelt und das Eiweiss mit aller Sorgfalt nach Scherer-Huppert bestimmt. Deshalb sei dem Faktor von Záhör der Vorzug gegeben. Das Eiweiss wurde von Záhör bei 120 bis 130° getrocknet und der Faktor gilt daher auch nur für solches.

B. Ausführung. Der Harn wird nach S. 1127 mit soviel Essigsäure versetzt, als zur vollständigen Fällung des Eiweisses beim Kochen erforderlich ist. Von dem so zur Koagulation hergerichteten

<sup>1)</sup> G. Lang, Orvosi Szemle (Ungarische med. Ztschr.) 2. Jahrg. 1862. — M. Haebler, Arch. f. Anat. etc. 1868. 397. — Bornhardt, Berlin. klin. Wochenschr. 34. 1869. 364. — Budde, Bibliothek für Laeger 20. Januar 1870; Hospitals Tidende, 28 und 29. 1870. — Huppert u. Záhör, Ztschr. f. physiol. Ch. 12. 467. — Záhör, das. 12. 484.

<sup>2)</sup> Th. Lohnstein, Pflügers Archiv 59. 479. 1895; 60. 136.



Harn wird die Dichte bestimmt. Es wird ferner dieser vorbereitete Harn zum Kochen erhitzt, so jedoch, dass er dabei durch Verdunstung von Wasser keine Änderung seiner Dichte erleidet. Zu diesem Zwecke füllt man den Harn in eine Medizinflasche von 200—300 ccm Inhalt und bindet in sie einen weichen Kautschukstopfen so ein, wie die Korke in den Sodawasserflaschen befestigt sind; die Stopfen müssen vorher mit Natronlauge ausgekocht und darauf wieder bis zum völligen Verschwinden der alkalischen Reaktion gewaschen werden; die Flasche stellt man in ein Gefäss mit Wasser, bringt dieses zum Kochen, erhält 10—15 Minuten im Sieden und hebt die Flasche dann aus dem Wasser. Nach dem Erkalten wird, wieder unter Verhütung des Verdunstens, filtriert. Man hat dazu einen Trichter mit einem durchbohrten Kork in eine Flasche gepasst, in den Trichter wird ein Faltenfilter gelegt und der Trichter mit einer Glasplatte bedeckt gehalten. — Man kann den Harn auch in einem offenen Gefäss kochen, muss aber dann nach dem Erkalten das ursprüngliche Gewicht durch vorsichtigen Zusatz von Wasser wieder herstellen.

Die Dichte des für die Koagulation vorbereiteten Harns und die des Filtrats bestimmt man am sichersten mit einem Sprengelschen Pyknometer (S. 9), weil die Bestimmung um so genauer wird, auf je mehr Dezimalen man die Dichten sicher ermittelt hat. Bei Verwendung von Aräometern werden die Resultate minder genau. Die Aräometer, welche dazu gebraucht werden sollen, sind nur dann geeignet, wenn sie die Dichte bis auf die 4. Dezimale angeben und wenn sie geächtet sind. Lohnstein hat sich dazu seines Aräometers (S. 6) bedient. — Harn und Filtrat müssen bei der Dichtebestimmung dieselbe Temperatur haben.

Die 14 von Záhó r untersuchten Harne enthielten im Mittel 0,3483% (0,0631—0,7634) Eiweiss. Die nach der densimetrischen Methode erhaltenen Resultate wichen von der Wägungsbestimmung um —0,0364 bis +0,0544 g oder im Mittel um 6,5% (0,9—24,6) ab; 9 mal betrug die Abweichung 0,9—4,3%, 1 mal 8,1, 3 mal 12,2 bis 13,7 und 1 mal, bei der kleinsten Eiweissmenge, 24,6%.

#### B. Aus der Abnahme des Stickstoffs bei der Koagulation.

Van Nuys und Lyons sowie Mann<sup>1)</sup> bestimmen in eiweisshaltigen: Harn den Stickstoff nach Kjeldahl (S. 480), in einem

<sup>1)</sup> T. C. van Nuys u. B. E. Lyons, Amer. chem. Journ. 12. 336; Chem. Zentralbl. 1890. 2. 121. — F. Mann, Ztschr. f. klin. Med. 20. 107. 1892.

gleichen Volumen enteiweissten Harn gleichfalls und berechnen aus der Stickstoffdifferenz die Menge des Eiweisses, wozu der Faktor 6,3 zu verwenden ist (S. 1129). Die Genauigkeit der Bestimmung hängt u. a. ab von der Genauigkeit, mit welcher das Eiweiss aus dem Harn abgeschieden wird.

Van Nuys und Lyons fällen den filtrierten Eiweissarn mit dem gleichen Volumen Alménscher Tanninlösung (S. 1116) und verwenden ein abgemessenes Volumen Filtrat für die Analyse. Der eiweisshaltige Harn wird mit seinem Volumen Wasser verdünnt und dann ein ebenso grosses Volumen wie vom Filtrat nach der Eiweissfällung für die Analyse abgemessen. Van Nuys und Lyons multiplizierten die Differenz mit 6,37; es ergab sich gegen die Wägungsbestimmung ein durchschnittlicher (absoluter) Fehler von 0,0092 % bei einem Eiweissgehalt von 0,0506 bis 1,1293 %; der grösste Fehler betrug 0,0357 % bei einem Eiweissgehalt von 0,4399 %, der kleinste Fehler 0,0006 % bei einem Eiweissgehalt von 0,0506 % Eiweiss. Harnsäure wird auch aus harnsäurereichem Harn durch Alménsche Lösung nur in kleinen Mengen gefällt.

### C. Refraktometrisch.

Ellinger<sup>1)</sup> verwendet das Oleorefraktometer von Amagat und Jean, ein Differenz-Refraktometer. Es wird der eiweisshaltige Harn und der durch Kochen bei passend saurer Reaktion vom Eiweiss befreite Harn nach Ersatz des beim Kochen verdunsteten Wassers untersucht. In das Prisma des Apparats kommt der eiweisshaltige, in das Gefäss mit den parallelen Glaswänden der enteiweisste Harn. Vorher war auf den Nullpunkt eingestellt, wozu beide Gefässe mit ein und derselben Flüssigkeit gefüllt waren. Bei der Verwendung der beiden Harne rückt die Grenzlinie zwischen hell und dunkel nach rechts, und der Grad dieser Abweichung vom Nullpunkt lässt sich an einer Skala ablesen. Ein Skalenteil gibt 0,106 % Eiweiss an. Bei 5 Bestimmungen betrug der mittlere Fehler 0,008 %, der grösste Fehler + 0,017 und - 0,020 %.

Nach Riegler<sup>2)</sup> fällt man aus 50 ccm Harn (von eiweissarmem aus 100 bis 200 ccm) das Eiweiss durch Zusatz von 5 ccm saurer Asaprollösung (S. 1115), erwärmt auf 60°, wäscht den Niederschlag mit 150 ccm Wasser aus, presst ihn ab und löst ihn in 25 ccm  $\frac{1}{10}$ n Kalilauge. Diese Lösung wird mit dem Refraktometer von Pulfrich untersucht. Um von der Temperatur unabhängig zu sein, wird sofort auch der Brechungsindex der Lauge ermittelt. Wenn man die Differenz der beiden Brechungsindizes in ganzen Zahlen ausdrückt, so beträgt sie für 1 g Eiweiss 540.

### D. Die optische Methode.

Die optische Methode ist in verschiedener Form von Vogel, von Esbach und von Christensen auf die Bestimmung des Ei-

<sup>1)</sup> H. O. G. Ellinger, Journ. f. prakt. Ch. [2] 44. 256. 1881.

<sup>2)</sup> E. Riegler, Wiener med. Blätter 48. 1895; Jahresber. f. Tierch. 1895. 261.

weisses angewendet worden. Von diesen Verfahrungsweisen wurden nur die von Vogel und von Christensen einer eingehenderen Prüfung auf ihre Genauigkeit unterzogen.

1. Christensen<sup>1)</sup> schätzt die Eiweissmenge aus dem Trübungsgrad, welchen mit Gerbsäure versetzter Harn zeigt. Es wird immer dasselbe Volumen Harn mit Gummi- und Gerbsäurelösung versetzt und wieder auf ein anderes bestimmtes Volumen verdünnt. Die Gerbsäurelösung wird hergestellt durch Lösen von 1 Teil Tannin in 100 Teilen Wasser und, um sie haltbar zu machen, mit Borsäure gesättigt; die Gummilösung hält den Niederschlag suspendiert. Von der Mischung wird soviel in ein Glas mit Wasser gegossen, bis die schwarzen Striche, welche auf einem unter das Glas gelegten Papier gezogen sind, nicht mehr voneinander unterschieden werden können. Aus dem dazu verbrauchten Volumen Mischung ergibt sich der Gehalt des Harns an Eiweiss. Der Apparat, welcher von Cornelius Knudsen in Kopenhagen bezogen werden kann, ist auf p. m. Eiweiss geachtet. — Der Harn muss so sauer sein, dass sich das Eiweiss beim Kochen gut abscheidet. Der Kochsalzgehalt und die Temperatur haben keinen Einfluss auf das Resultat. Man kann die Bestimmung auch bei künstlicher Beleuchtung vornehmen.

Aus 31 Bestimmungen, welche Christensen mit Harnen anstellte, welche im Mittel 6,07 p. m. (0,9—23,2) Eiweiss enthielten, ergab sich ein mittlerer absoluter Fehler von 0,62 g im Liter (—1,0 bis + 2,8) und ein mittlerer relativer von 12,2 % (0—40,0). Unter 31 Fällen wurde nur 6 mal zu wenig gefunden. Die Abhandlung enthält noch weitere Belege. — Wideroe<sup>2)</sup> kann die Methode nicht besonders empfehlen. Die von Walbum (s. unten) ist nach ihm vorzuziehen.

2. Vogels optische Methode. Man säuert den Harn schwach mit Essigsäure an, verdünnt gemessene Mengen von 4 oder 6 ccm etc. mit Wasser auf 100 ccm, erhitzt zum Sieden, kühlt rasch ab und prüft nun, ob der Lichtkegel einer Stearinkerze durch eine 6,5 cm dicke Schichte der Mischung noch sichtbar ist. Man wiederholt den Versuch bei verschiedenen Konzentrationen, bis man den Verdünnungsgrad getroffen hat, bei welchem das Flammenbild gerade verschwindet. Der Prozentgehalt des Harns an Eiweiss wird gefunden, wenn man mit der Anzahl der verbrauchten Kubikzentimeter Harn in die aus Wägungsbestimmungen von Dragendorff abgeleitete Mittelzahl, 2,3553, dividiert. — Dragendorff führte 35 vergleichende Analysen aus, 3 mal zeigten sich Differenzen von mehr als 0,1, 11 mal von mehr als 0,05, so dass also von 35 Analysen 21 bis auf 0,05 mit der gewichtsanalytischen Methode übereinstimmten. Masing<sup>3)</sup> erhielt in 7 vergleichenden Analysen Differenzen bis zu 20 %.

3. Nach demselben Prinzip bestimmte Esbach<sup>4)</sup> die Menge des im Harn enthaltenen Eiweisses nach der Stärke des mit seinem Reagens erzeugten Niederschlags. Den Hintergrund, nach welchem man zu blicken hat, bildet ein Blatt Papier, auf welches mehrere parallele ungefähr 1 mm breite Striche in kurzem Abstand voneinander gezogen sind. Dieser Hintergrund ist durch einen Schirm in eine linke und eine rechte Hälfte geteilt. Vor der linken Hälfte befestigt man ein oder zwei fein matt geschliffene Glastafeln (oder Milchglas); die schwarzen Striche erscheinen dann breiter und die weissen Zwischenräume verschmälert. Es wird weiter vor den Glastafeln ein Zylinder mit gelb gefärbtem Wasser (verdünntem

<sup>1)</sup> A. Christensen, Virchows Archiv **115**. 132. 1889. — A. Christensen u. J. Mygge, Hospitals-Tidend. Kjobenhavn 1888. Jahresb. f. Tierch. 1888. **18**. 314. S. Wideroe, Norsk. Magazin for Laegevidenskaben **69**. 1082. 1908.

<sup>2)</sup> L. Wideroe, Norsk. Magazin for Laegevidenskaben. **69** 1082. 1908.

<sup>3)</sup> A. Vogel, Arch. f. klin. Med. **3**. 143. 1867; Ztschr. f. analyt. Ch. **7**. 152. — E. Masing, Arch. f. klin. Med. **4**. 229. 1868.

<sup>4)</sup> G. Esbach, Bullet. de Thér. Janv. 1874; Gaz. méd. de Paris **5**. 1874; Dosage de l'alb. Paris, Doin, 1874.



Reagens) aufgestellt. Man misst dann in einen anderen Zylinder (ein langes dickwandiges Reagensglas) ein bestimmtes Volumen (1 ccm) Eiweisslösung von bekanntem Gehalt, setzt einige Kubikzentimeter des Esbachschen Reagens (10 g Pikrinsäure und 20 g Zitronensäure im Liter zu), schüttelt um und verdünnt die Mischung so lang, bis durch sie die Striche ebenso breit erscheinen, wie durch die Glastafeln und die gelbe Flüssigkeit. Man erfährt auf diese Weise, wieviel Eiweiss in dem gemessenen Gesamtvolumen Mischung enthalten ist. Nach dieser Eichung wird der Zylinder weiter geteilt, und zwar so, dass man sogleich den Gehalt des Eiweisses im Liter Harn ablesen kann. Bei der Ausführung der Bestimmung verfährt man wie bei der Eichung. Man verwendet zu einem Versuch 1 ccm Harn von mittlerem Eiweissgehalt, von eiweissärmerem mehr, von eiweissreicherem weniger. Nach Esbach ist diese Bestimmung bis auf 0,1—0,3 g Eiweiss im Liter genau. — Esbach hat das Verfahren noch in soweit abgeändert, als er die Harnprobe von vornherein zu stark, aber auf ein festes Volumen verdünnt und dann das Papier mit den Strichen so weit von dem Zylinder entfernt, dass die Striche ebenso breit erscheinen wie links. Die Strecke, um welche der Hintergrund verschoben wurde, bildet das Mass für den Eiweissgehalt.

4. Zu 100 ccm Harn fügt man nach Renard<sup>1)</sup> Jodquecksilberjodkaliumlösung und bringt die Flüssigkeit in ein graduiertes Reagenzglas, auf dessen Boden eine Emailplatte mit einem schwarzen Punkt sich befindet. Die Höhe der Flüssigkeit, bei der der Punkt eben nicht mehr sichtbar ist, gibt direkt den Eiweissgehalt an.

5. Das Verfahren von Walbum. Das Prinzip besteht darin, dass eine Eiweisslösung von Trichloressigsäure getrübt wird. Es wird Harn in einem besonderen Apparat (von Altmann in Berlin mit Gebrauchsanweisung zu beziehen) mit einer bestimmten Menge Reagens versetzt und dann mit einem Normalglas, das gleichgetrübtetes Eiweiss aus Menschenserum enthält, verglichen. Wideroe fand das Verfahren brauchbar. Nach Pieper<sup>2)</sup> liefert dasselbe meist zu hohe Werte.

### E. Verfahren von Roberts-Stolnikoff.

Das Verfahren ist gleichzeitig von Roberts und von Stolnikoff beschrieben worden. Hammarsten hat dann mit Brandberg<sup>3)</sup> und anderen seiner Schüler das Eiweiss im Harn sowohl nach dieser Methode als durch Wägung bestimmt und damit die Brauchbarkeit des Verfahrens für klinische Zwecke nachgewiesen.

A. Prinzip. Harn wird soweit mit Wasser verdünnt, bis eine Probe die Hellersche Eiweissreaktion (S. 1110) erst nach Ablauf einer bestimmten kurzen Zeit schwach, aber deutlich gibt. Nach Brandberg tritt die Reaktion in der angegebenen Stärke mit einer Eiweisslösung in 2—3 Minuten ein, wenn die Lösung  $3\frac{1}{3}$  mg Eiweiss in 100 ccm enthält. Ist der Harn soweit verdünnt, dass er die Reaktion in derselben Zeit in gleicher Stärke gibt, so enthält er gleichfalls  $3\frac{1}{3}$  mg in 100 ccm, woraus sich berechnen lässt, wieviel Eiweiss im ganzen

<sup>1)</sup> A. Renard, Mon. scient [4] 19. II. 832. 1905.

<sup>2)</sup> L. E. Walbum, Deutsche med. Wochenschr. 34. 1728. 1908. Wideroe, Norsk Magazin for Laegevidenskapen. 69. 1082. 1908. — R. Pieper, Diss. Leipzig 1909.

<sup>3)</sup> W. Roberts, Med. chirurg. Transact. 59. 148. — J. Stolnikoff, Petersburger med. Wochenschr. 12. 1876. — J. Brandberg, Jahresber. f. Tierch. 1880. 265. — Hammarsten, das. 1883. 217.

Volumen des verdünnten Harns enthalten ist. Dieselbe Menge Eiweiss enthält dann auch das zum Verdünnen verwendete Volumen Harn.

Musculus<sup>1)</sup> bedient sich desselben Prinzips, bestimmt aber die Eiweissmenge nicht nach dem Grade der Verdünnung, sondern nach der Zeit, in welcher der auf ein bestimmtes festes Volumen verdünnte Harn den Eiweissring zeigt. Musculus hat diese Zeiten für einen Eiweissgehalt von 0,01—0,20 p. M. angegeben.

B. Ausführung. Die Proben stellt man so an, dass man auf den Boden eines Reagenzglases mit einer Pipette, ohne die Wand zu benetzen, eine gegen 1 cm hohe Schicht konzentrierte Salpetersäure bringt und auf diese den verdünnten Harn schichtet. Man saugt dazu den verdünnten Harn in eine spitz ausgezogene Pipette, führt diese bis nahe zur Oberfläche der Salpetersäure und lässt nun den Harn langsam an der Wand des Reagenzglases herab auf die Säure fließen, indem man die Pipette in dem Masse zurückzieht, als die Flüssigkeit steigt. Man lässt dabei und nachher das Reagenzglas im Gestell ruhig stehen. Dann beobachtet man mit der Uhr in der Hand, in welcher Zeit der weisse Streifen gegen einen dunklen Hintergrund schwach, aber deutlich sichtbar wird. Wie bemerkt, ist diejenige Verdünnung die richtige, bei welcher die Reaktion in 2—3 Minuten eintritt.

Die Genauigkeit des Resultats hängt wesentlich ab von der Art, wie man sich von der Gegenwart des Eiweissringes überzeugt, ob man das Glas, wie man nicht soll, gegen einen hellen, oder gegen einen dunklen Hintergrund beobachtet. Daraus, aus der verschiedenen Dicke der Schicht und aus noch anderen Umständen erklärt sich wohl auch, dass man nach Roberts bei einem Gehalt des verdünnten Harns von 3,4 mg, nach Stolnikoff bei einem solchen von 4 mg in 100 cem die ersten Anzeichen einer Trübung in 35—40 Sekunden, eine deutliche Trübung nach 1½ Minuten wahrnehmen soll.

Im weiteren unterscheidet sich die Ausführung nach der Art, wie die Verdünnung vorgenommen wird.

### 1. Nach Brandberg.

Die Verdünnung des Harns nimmt man in folgender Weise vor. Man verdünnt den Harn in einem Masszylinder zunächst auf das zehnfache; in der Regel erscheint dann der Ring zu früh. Dann misst man je 10 cem Wasser in Reagenzgläser und lässt in das 1. Glas aus einer Burette 1 cem, in das 2. Glas 2 cem usf. von dem verdünnten Harn zufließen und schüttelt um. Unter diesen Proben befinden sich zwei um 1 cem verdünnten Harn unterschiedene, von welchen die eine den Eiweissring zu spät und die andere zu früh zeigt. Man nimmt dann zu den weiteren Proben von dem 10 fach verdünnten Harn Volumina, welche zwischen den beiden so aufgefundenen Grenzwerten liegen und erfährt auf diese Weise das von dem 10 fach ver-

<sup>1)</sup> Musculus, Jahresb. f. Tierch. 1880. 268.

dünnten Harn für die richtige Reaktion erforderliche Volumen auf Zehntel-Kubikzentimeter genau. Wieviel Gramm Eiweiss in 100 ccm

enthalten sind, lässt sich nach der Formel  $\frac{10 + V}{30 V}$  berechnen, worin

V das Volumen des 10fach verdünnten Harns bedeutet, welches zu 10 ccm Wasser hinzugesetzt werden musste. Waren von diesem z. B. 6,5 ccm für die richtige Probe erforderlich, so enthielt der Harn

$$\frac{16,5}{30 \cdot 6,5} = 16,5 : 195 = 0,086 \text{ g Eiweiss in } 100 \text{ cc.}$$

Es versteht sich von selbst, dass die Volumina möglichst genau, also mit der Bürette, abgemessen werden müssen.

Die Formel, mittels welcher der Eiweissgehalt des Harns berechnet wird, ergibt sich aus folgender Betrachtung. Wenn für den rechtzeitigen Eintritt der Reaktion 10 ccm Wasser mit V ccm 10fach verdünntem Harn versetzt worden sind, so enthalten 10 + V ccm der Mischung V ccm verdünnten oder  $\frac{V}{10}$  ccm und

100 ccm der Mischung  $\frac{100 V}{10(10 + V)} = \frac{10 V}{10 + V}$  ccm unverdünnten Harn. In

diesen 100 ccm der Mischung oder in  $\frac{10 V}{10 + V}$  ccm unverdünntem Harn sind  $3\frac{1}{3}$  mg

Eiweiss enthalten, in 100 ccm unverdünntem Harn demnach  $\frac{1000}{3} \cdot \frac{10 + V}{10 V}$  mg

oder  $\frac{10 + V}{30 V}$  g Eiweiss.

Mittels der Methode von Brandberg wurden Werte erhalten, die den gewichtsanalytisch festgestellten ziemlich nahe stehen (Serkowski und Zieleniewski)<sup>1)</sup>.

Die Resultate fallen für klinische Zwecke hinreichend genau aus. In den 68 Bestimmungen von Hammarsten und seinen Schülern wich das nach diesem Verfahren erhaltene Resultat 48 mal um weniger als 0,05 g von der gewogenen Eiweissmenge ab, und 20 mal um mehr als 0,05 g; in 12 von diesen 20 Fällen erreichte der Fehler die erste Dezimale und einmal betrug er 0,3 g. In den 23 im einzelnen mitgeteilten Beobachtungen Brandbergs weicht die nach Roberts-Stolnikoff bestimmte Eiweissmenge im Mittel um 13,8% (0,2 bis 40,2) von der gewogenen ab.

Die von Hammarsten beobachteten starken Abweichungen bei nicht sehr grossem Eiweissgehalt beruhen nach ihm nicht sowohl auf einer fehlerhaften Anwendung der Methode, sondern hängen vielmehr von noch nicht genau erforschten Eigentümlichkeiten eines im Harn bisweilen auftretenden Eiweisskörpers ab.

<sup>1)</sup> St. Serkowski u. Zieleniewski, Przegląd lekarski. 47. 613. 1908. Jahresb. f. Tierch. 38. 323.



Carry<sup>1)</sup> empfiehlt das Verfahren von Brandberg, mit welchem man in  $\frac{1}{4}$  Stunde den Eiweissgehalt bestimmen kann. Der Durchschnittfehler ist geringer als 5 cg pro Gramm Eiweiss.

Auch Högerstedt<sup>2)</sup> empfiehlt die Verdünnungsgrenze festzustellen, bei der die Hellersche Probe in 3 Minuten eben noch auftritt. Die Hellersche Probe gibt bei einem Eiweissgehalt von 1:30 000 eine in der dritten Minute auftretende, eben noch wahrnehmbare Trübung.

## 2. Nach Mittelbach.

Mittelbach<sup>3)</sup> beabsichtigt mit seinem Verfahren nicht die genauen Werte für den Eiweissgehalt des Harns zu bestimmen, sondern nur Grenzwerte. Dieses abgekürzte Verfahren wird dem Praktiker genügen, die Veränderungen im Eiweissgehalt des Harns bei dem einzelnen Fall zu verfolgen. Als Massgefäss kommt ausser einem 100 ccm fassenden, in ganze ccm geteilten Zylinder eine 5 ccm fassende, in Zehntel-Kubikzentimeter geteilte Pipette in Verwendung. Eigenartig ist dem Verfahren ferner, dass der verdünnte Harn durch weitere Verdünnung noch zu einer zweiten Probe verwendet werden kann.

Zur Bestimmung braucht man die folgende Tabelle. In dieser gibt die Reihe I an, auf welches Volumen der Harn zu verdünnen ist; bei der Wahl der Harnmenge richtet man sich nach dem Ausfall der qualitativen Probe. Der Harn wird mit der Messpipette in den Messzylinder gemessen und der Zylinder bis zu dem angegebenen Volumen aufgefüllt; Zehntelkubikzentimeter Wasser setzt man aus einer gewöhnlichen Pipette zu, wobei man 2 Tropfen = 0,1 ccm rechnet. Für die zweite Verdünnung giesst man so viel Flüssigkeit aus dem Zylinder ab, dass der Rest das gewünschte Volumen ausmacht. Tritt die Hellersche Probe zu zeitig ein, so verdünnt man die Mischung noch einmal, indem man entweder zur nächsten horizontalen Reihe in der vertikalen Reihe II oder zur zweitnächsten horizontalen Reihe in der vertikalen Reihe III übergeht. Hat man z. B. (nach I Nr. 4) 3 ccm Harn auf 90 ccm verdünnt, so kann man von dieser Mischung entweder 60 ccm auf 90 ccm verdünnen (II Nr. 5) oder 40 ccm auf 90 ccm (III Nr. 6). Reihe IV gibt den Grad der Verdünnung und den Gehalt des Harns an Eiweiss in Grammen für 100 ccm an.

<sup>1)</sup> Carry, Lyon médical 100. 630. 1903.

<sup>2)</sup> A. Högerstedt, St. Petersburger med. Wochenschr. 29. 51. 1904.

<sup>3)</sup> F. Mittelbach, Prager med. Wochenschr. 1898. Nr. 30, 31.

No.	I.		II.		III.		IV.	
	Harn	Volumen	Mischung	Volumen	Mischung	Volumen	Verdünnung	Eiweiss
1	1	1	—	—	—	—	0	0,003
2	30	90	—	—	—	—	3	0,01
3	6	90	20	100	—	—	15	0,05
4	3	90	50	100	10	100	30	0,10
5	2	90	60	90	30	90	45	0,15
6	1,4	94,5	60	90	40	90	67,5	0,22
7	1,1	89,5	75	90	45	81,4	81,4	0,27
8	0,9	87,5	75	90	50	72	97,2	0,32
9	0,6	70	75	90	60	86	116,6	0,39
10	0,6	87	64	80	48	72	145,0	0,49
11	0,5	91,1	64	80	50	62,5	182,2	0,60
12	0,4	87,5	75	90	60	90	218,7	0,73
13	0,4	97,2	72	80	60	80	243,0	0,81
14	0,3	81	72	80	60	74,1	270,0	0,90
15	0,3	90	72	80	60	74,1	300,0	1,00

Tritt in einer der Proben der Niederschlag rechtzeitig ein, so enthält der Harn diejenige Menge Eiweiss, welche in der zu der Verdünnung gehörigen horizontalen Reihe angegeben ist. Erscheint der Niederschlag in dem einen Fall zu früh, in dem anderen Fall zu spät, so liegt die Eiweissmenge zwischen den beiden in IV angegebenen Grössen als Grenzwerten; nach dem gewählten Beispiel würde der Harn also zwischen 0,10 und 0,15 oder 0,22 g Eiweiss in 100 ccm enthalten, je nachdem man nach Reihe II oder nach Reihe III weiter verdünnt hat.

Wenn die Reaktion bei der ersten Probe zu spät eintritt, so hat man eine konzentriertere Harnverdünnung herzustellen, tritt sie in beiden Proben zu zeitig ein, so muss man mit einer stärkeren Verdünnung von vorn anfangen. Mit der Tabelle kommt man für die gewöhnlichen Fälle aus. Enthält der Harn aber ausnahmsweise mehr als 1% Eiweiss, so hat man ihn von vornherein auf das Doppelte zu verdünnen und die Untersuchung in der angegebenen Weise auszuführen, dann aber auch den der Tabelle entnommenen Wert zu verdoppeln. Bei wiederholter Untersuchung des Harns eines Kranken vereinfacht und kürzt sich das Verfahren dadurch, dass aus den früheren Untersuchungen bereits bekannt ist, wieviel Eiweiss man ungefähr zu erwarten hat.

### 3. Methode von O. Mayer<sup>1)</sup>.

Auf dem gleichen Prinzip beruht die von Mayer zur schnellen approximativen Eiweissbestimmung im Harn angegebene Methode. 5 bis 10 ccm einer Lösung von 5 g Sublimat, 5 g Zitronensäure und 40 g Kochsalz in 500 ccm Wasser werden in konischen Gläsern vorsichtig aus fein ausgezogener Pipette mit etwa 5 ccm Harn überschichtet. Bei einer Verdünnung von 1:100 000 entsprechend 0,001% Eiweiss bildet sich hierbei an der Grenze beider Flüssigkeiten nach etwa  $1\frac{1}{2}$  Min. ein scharf begrenzter, weisslicher Ring. In eiweisreicherem Harn wird der Ring schon früher sichtbar. Man verdünnt in diesem Falle mit abgemessener Menge Wasser, bis die Reaktion in der angegebenen Zeit eintritt. Aus dem Verdünnungsgrade berechnet man nun den Gehalt an Eiweiss.

Die Methode soll, was Genauigkeit und Schnelligkeit anbetrifft, die Methode von Esbach übertreffen.

### F. Absatzmethoden.

Prinzip. Aus der Höhe eines in bestimmter Weise erhaltenen Eiweissniederschlags wird nach einer empirischen Skala der Gehalt des Harns an Eiweiss geschätzt.

#### 1. Verfahren von Esbach.

Seit die Kochprobe (S. 1106) zum Nachweis des Eiweisses im Gebrauch ist, hat man gehofft, aus der Höhe des dabei entstehenden Niederschlags die Eiweissmenge wenigstens annähernd schätzen zu können; aus J. Vogels Untersuchung hat sich aber ergeben, dass dabei Fehler bis zu 50 % unterlaufen können; in 9 solchen Versuchen von Veale betrug der Fehler im Mittel 13,4 % (6,3 bis 21,0) des Eiweisses. Die Ursache dieses Fehlers glaubte man darin suchen zu müssen, dass der Niederschlag nicht immer gleich dicht werde. Esbachs<sup>2)</sup> Bestreben ist nun dahin gerichtet gewesen, durch Anwendung eines besonderen Verfahrens den Niederschlag gleichmässiger zu erhalten.

Ausführung. Das Esbachsche Reagens, mit welchem das Eiweiss gefällt wird, ist eine Lösung von 10 g Pikrinsäure und 20 g Zitronensäure im Liter. Die Fällung wird vorgenommen in einem graduirten Rohr, dem Albuminimeter. Dasselbe hat die Gestalt eines Reagenzglases, ist aber stärker in der Wand, hat eine Länge von 15 cm und eine lichte Weite von 15—16 mm. Etwa 6 cm über dem runden

<sup>1)</sup> O. Mayer, Schweiz. Wochenschr. f. Chem. u. Pharm. 45. 446. 1907. Chem. Zentralbl. 1907. II. 853.

<sup>2)</sup> H. Veale, Brit. med. Journ. 1884. I. 898. — G. Esbach, Bulletin de Thérap., Janv. 1874; Gazette méd. de Paris 5. 1874. 61; Dosage de l'alb. Paris, Doin, 1874; Dosage de l'albumine. 7. édit., Paris, Brewer frères, 1886.



Boden befindet sich ein mit U, 4 cm über U ein mit R bezeichneter Strich; ferner sind vom Boden aus bis zu einer Höhe von ungefähr 4 cm, mit 0,5, 1, 2 usw. numerierte Striche in nach oben immer geringer werdenden Abständen aufgetragen. Bis zur Marke U wird der Harn in den Zylinder gefüllt, so, dass der Strich den Scheitel des Meniscus tangiert, bis zur Marke R ebenso das Reagens. Dann schliesst man das Glas mit einem Kautschukpfropfen, kehrt es 10—12 mal um, ohne zu schütteln, und lässt es aufrecht in einem Gestell stehen. Nach 23—24 Stunden liest man die Höhe des Niederschlags an den mit den Zahlen versehenen Strichen ab; sie geben an, wieviel Gramme Eiweiss im Liter Harn enthalten sind. Diese Striche liegen nach oben immer näher aneinander, weil die unteren Eiweisschichten durch die auf ihnen lastenden zusammengedrückt werden und nun eine geringere Höhe einnehmen, als wenn sie sich allein abgesetzt haben. Die Zylinder müssen selbstverständlich rein und trocken gebraucht werden.

Bei der Ausführung des Verfahrens sind noch einige von Esbach aufgestellte Regeln zu berücksichtigen. Der Harn muss sauer reagieren; ist dies nicht der Fall, so säuert man ihn mit Essigsäure deutlich an. Seine Dichte soll ferner die von 1,006—1,008 nicht überschreiten; ist er zu konzentriert, so verdünnt man ihn entsprechend. Die Resultate fallen endlich auch genauer aus, wenn der Harn nicht über 4 g Eiweiss im Liter enthält; ergibt ein Versuch mehr oder deutet eine andere Probe auf einen stärkeren Gehalt, so wird der Harn gleichfalls entsprechend verdünnt; selbstverständlich kann man mit einem anscheinend zu eiweissreichen Harn zwei oder mehr Proben gleichzeitig ansetzen, eine mit unverdünntem und die andere mit verdünntem Harn. Nach Schulz, sowie nach Christensen<sup>1)</sup> ist die Temperatur von grossem Einfluss auf die Höhe des Niederschlags; sie ist bei niedriger Temperatur erheblich grösser, bei höherer Temperatur erheblich kleiner als bei Zimmertemperatur, bei welcher die Probe angestellt werden soll.

Nach Johnson<sup>2)</sup> gibt eine Lösung bloss von Pikrinsäure, welche 11,43 g im Liter enthält, beiläufig dieselben Resultate, wie die zugleich Zitronensäure enthaltende Lösung von Esbach; bei Verwendung einer Lösung von Pikrinsäure allein mit 10 g im Liter, wie bei Esbach, ist der Niederschlag zu locker und die Schicht zu hoch, mit gesättigter Pikrinsäurelösung der Niederschlag zu dicht.

Verdünnt man einen Harn von der Dichte  $d$  auf das  $n$ fache, so hat er dann die Dichte  $1 + \frac{d-1}{n}$ ; ein Harn, welcher z. B. die Dichte von 1,021 besass, zeigt, nach dem Verdünnen auf das 3fache die Dichte 1,007.

<sup>1)</sup> H. Schulz, Deutsche med. Wochenschr. 32. 1886. 558. — A. Christensen, Virchows Archiv 115. 131. 1889.

<sup>2)</sup> G. Johnson, Lancet 1836. II. 63.

Wie aus den aufgestellten Versuchsbedingungen hervorgeht, kommt für den richtigen Ausfall des Resultats sehr viel auf die Dichte der Flüssigkeit an, in welcher sich der Eiweissniederschlag zu Boden senkt. Wegen dieser Bedeutung der Dichte des Mediums ist das Verfahren daher auch nicht zur Bestimmung des Eiweisses in anderen Flüssigkeiten, z. B. in Transsudaten, verwendbar.

Noch bedeutender erweist sich aber der Einfluss der Temperatur. Dieser zeigte sich in den Versuchen von Schulz in der Weise, dass der Niederschlag, welcher bei 12—15° C ausgefallen war, eine 4,5—4,7 p. M. Eiweiss entsprechende Höhe einnahm, während der bei 2—4° entstandene Niederschlag 7,6—7,8, der bei 0° ausgefallene 7,0 p. M. Eiweiss angezeigt hätte. Christensen beobachtete, dass eine Probe, welche nach der Anzeige des Albuminimeters bei 15° 9 p. M. enthalten hätte, bei 35° in  $\frac{1}{2}$  St. auf 3, und in weniger als 2 St. auf 1,5 p. M. herabging. Eine bei 15° hingestellte Probe gab 3,5 p. M. Eiweiss an, während zwei andere bei 8,5—10° aufbewahrte Proben 5,5 und 6,6 p. M. Eiweiss zeigten. Der Einfluss der Temperatur ist nicht sowohl aus einer Änderung des spez. Gewichts, als vielmehr in einer Änderung der Viskosität (inneren Reibung) der Flüssigkeit zu suchen. Eine warme Flüssigkeit ist flüssiger als eine kalte und wird daher auch einem fallenden Körper leichter ausweichen und Platz machen, als eine kalte.

Nach Esbach ist das Verfahren für die eiweissarmen Harnе bei febriler Albuminurie weniger geeignet, als für die eiweissreicheren bei Nephritis und bei Herzkrankheiten. — Mit Harn, der nach dem Gebrauch von Chinin, Thallin oder Antipyrin entleert war, erhielt Ritter keine günstigen Resultate.

Johnson, Schulz, Sokolow, sowie Geissler bezeichnen das Verfahren als brauchbar für die Zwecke des praktischen Arztes und Dillner, Veale, Ritter, Czapek sprechen sich auf Grund ihrer Untersuchungen gleichfalls günstig über das Verfahren aus. Christensen dagegen, Grutterink sowie Rössler<sup>1)</sup> verwerfen es.

In Dillners 35 Bestimmungen betrug der mittlere Fehler bei einem Eiweissgehalt des Harns von 0,05—2,13 % 0,054 g, der kleinste 0,002 g, der grösste, der aber nur 4 mal vorkam, 0,1 g. — Veale hat 10 Harnе mit 4,06 p. M. (3,0—5,4) Eiweiss untersucht. Die Abweichung von den Wägungsbestimmungen waren positiv und negativ, schwankten zwischen —0,8 und +0,5 g im Liter und betrugen im Mittel 6,6 % (0—21,0) des gewogenen Eiweisses. — Ritter sowie Czapek erhielten nach Esbach stets weniger Eiweiss als durch Wägen, und zwar nahm der Fehler im allgemeinen mit der Menge des Eiweisses zu. In den 15 Fällen von Ritter enthielt der Harn im Mittel 0,127 % (0,022—0,34) Eiweiss. Die Abweichung betrug im Mittel 0,017 g (0,005—0,038) oder 16,2 % (5,9—28,6) des gewogenen Eiweisses. — Die 23 Harnе, welche Czapek untersuchte, enthielten im Mittel 0,21 % (0,05 bis 0,52) Eiweiss. Der Fehler betrug im Mittel 0,045 g (0—0,16) Eiweiss oder 18 % (0—50) des gewogenen Eiweisses. — Christensen und Mygge haben denselben Harn, in welchem Christensen das Eiweiss dem Gewicht nach bestimmte, jeder für sich an einem anderen Ort nach Esbach untersucht, und zwar Christensen in 33, Mygge in 32 Fällen. Der Harn stammte von 8 verschiedenen Kranken und enthielt 0,4—8,9 p. M. im Mittel 3,57 (Christensen) und 3,95 (Mygge) Eiweiss. Bei Mygge betrug der Fehler im Mittel 0,95 g (—3,5 bis +1,3) oder 22,6 % (—56,7 bis +59,0), bei Christensen 0,86 g (—1,7 bis +3,4) oder 26,8 % (—21,5

<sup>1)</sup> Sokolow, das. 1887. 223. — Th. Geissler, Berliner klin. Wochenschr. 51. 1889. — H. J. Dillner, Jahresb. f. Tierch. 1886. 226. — H. Veale, a. a. O. — S. Ritter, Beiträge zur quantitativen Eiweissbest. Diss. Breslau 1887. 37. — F. Czapek, Prager med. Wochenschr. 15. 1888. 128. — Alide Grutterink, Nederl. Tijdschr. voor Pharm. 6. 75; Chem Zentralbl. 1894. 1. 846. — O. Rössler, Apotheker-Ztg. 14 293; Chem. Zentralb. 1894. 1. 976.

bis + 75 %) des gewogenen Eiweisses. Diese Parallelbestimmungen nach Esbach hatten also ein sehr verschiedenes Resultat; die Unsicherheit des Ergebnisses geht noch deutlicher aus dem Umstand hervor, dass in 13 Fällen der Fehler bei Christensen positiv war, wo er sich bei Mygge als negativ ergeben hatte. Diese Verschiedenheiten haben ihren Grund hauptsächlich in der Ungleichheit der Temperatur, bei welcher die Versuche ausgeführt wurden. Der Umstand, dass von Ritter und von Czapek nach Esbach immer weniger Eiweiss gefunden wurde, ist vielleicht gleichfalls darin zu suchen, dass bei diesen Versuchen die Temperatur höher war, als sie sein sollte (bei Czapek 20°); oder darin, dass die Albuminometer für Eiweiss geeicht waren, das bei niedriger Temperatur getrocknet wurde, als in den Bestimmungen von Ritter und von Czapek. — Tsuchiya fand ebenfalls die Esbachsche Probe sehr wenig zuverlässig.

Für eine auch nur einigermaßen befriedigende Bestimmung der absoluten Eiweissmenge ist das Esbachsche Verfahren also durchaus nicht brauchbar. Es lässt nur grobe Schätzungen zu, die kaum genauer ausfallen, als die Schätzung der Eiweissmenge nach der Höhe des bei der Kochprobe entstehenden Niederschlags. Wenn jedoch die Bestimmungen nach Esbach immer bei derselben Temperatur und unter Einhaltung der übrigen Regeln vorgenommen werden, so wird man erfahren können, ob der Eiweissgehalt eines Harns zu- oder abgenommen hat; vernachlässigt man die Temperatur, so kann es allerdings geschehen, dass man die Eiweissmenge gegen früher vermehrt findet, wo sie in Wirklichkeit vermindert ist und umgekehrt.

Die mit der Methode von Esbach erhaltenen Werte wichen nicht selten beträchtlich (oft um 50 %) von den gewichtsanalytisch festgestellten ab. Auch wenn die Harnproben bis zum spez. Gewicht von 1010 verdünnt wurden, wurden die Resultate nicht genauer (Serkowski und Zieleniewski)<sup>1)</sup>.

Die Esbachsche Probe ist nach Schippers<sup>2)</sup> der Probe von Tsuchiya überlegen, zumal, wenn nichteiweissartige Fällungen durch Verdünnen umgangen werden.

Die kristallinenischen Fällungen im Harn durch das Esbachsche Reagens sind der Pikrinsäure zuzuschreiben. Pikrinsäure (10 g pro Liter) mit Harn gekocht, gibt nach dem Erkalten einen kristallinenischen Niederschlag, der ein Kreatinbipikrat ist (Mayerhofer)<sup>3)</sup>.

Die Fehlerquellen der Esbachschen Probe liegen nicht im Zuckergehalt, sondern nach Pekelharing wahrscheinlich in Kolloiden, die nicht näher bekannt sind, die sich durch Dialyse nicht beseitigen lassen. In derartigen Fällen konnte durch Sieden mit  $\frac{1}{5}$  Volum starker Essigsäure die ausgiebigste Eiweissfällung mit Esbachs Verfahren erhalten werden (van der Harst)<sup>4)</sup>.

2. Modifikation der Esbachschen Eiweissprobe von Kwilecki<sup>5)</sup>. Der Harn wird in einem eigenen Apparate mit 10 Tropfen 10%-iger Eisenchloridlösung versetzt und dann mit dem Esbachschen Reagens. Stellt man dann in Wasser von 72°, so kann man schon nach 5–6 Minuten ablesen. Winiwarter empfiehlt diese Vorschrift.

<sup>1)</sup> St. Serkowski und Zieleniewski, *Przeglad lekarski* 47. 613. 1908; *Jahresber. f. Tierch.* 38. 323.

<sup>2)</sup> J. C. Schippers, *Zentralbl. f. inn. Med.* 30. 1001. 1909.

<sup>3)</sup> E. Mayerhofer, *Wiener klin. Wochenschr.* 22. 90. 1909.

<sup>4)</sup> J. C. van der Harst, *Pharm. Weekbl.* 45. 489. 1908.

<sup>5)</sup> Kwilecki, *Münch. med. Wochenschr.* 56. 1330. 1909. — H. v. Winiwarter, *Le scalpel et Liège méd.* 62. 92. 1909.



3. Schnellmethode zur Eiweissbestimmung von Aufrecht<sup>1)</sup>. Die Methode beruht auf dem gleichen Prinzip, wie die von Esbach. Durch einen besonderen Apparat und Zuhilfenahme der Zentrifuge soll die Methode verfeinert und beschleunigt werden. Der Apparat besteht aus einem unten geschlossenen Reagenzrohr, das in seinem erweiterten oberen Teil die Marke R trägt, in dem engeren unteren Teil kommt zunächst die Marke U, dann folgen die Teilstriche 1,7%, 1,6% usw. bis 0,01%. 4 ccm des sauer reagierenden Harns und 3 ccm Reagens (1,5% Pikrinsäure und 3% Zitronensäure) werden in das Röhrchen gebracht, dieses mit einem Gummistopfen verschlossen, dann wird gemischt in eine Zentrifuge gebracht und nach 2 Minuten die Höhe des Niederschlages abgelesen. Verdünnen eiweissreicher Harns ist nicht erforderlich. Bei uratreichen Harnen sind die Werte etwas zu hoch. Die Werte sollen mit den gewichtsanalytischen fast absolut übereinstimmen. Die Niederschlagshöhe ist nach Aufrecht weder von der spezifischen Dichte, noch von der Temperatur abhängig, was einen grossen Vorteil gegenüber der Esbachschen Methode bedeuten würde. — Eine flockige Ausscheidung an der Oberfläche bei säure- und uratreichen Harnen findet nie statt.

Braungard hat einen ganz ähnlichen Apparat angegeben und ebenfalls mit der Zentrifuge die Probe rasch ausführbar gemacht. Die Werte sollen von den gewichtsanalytischen um höchstens 0,3% abweichen. Auch er benutzt Pikrin- und Zitronensäure.

Rüde<sup>2)</sup> versuchte die Esbachsche Methode durch Zuhilfenahme der Zentrifuge zu verbessern. Eine grössere Genauigkeit lässt sich nicht erzielen, wohl aber kommt man verhältnismässig rasch zum Ziel.

#### 4. Verfahren von Tsuchiya.

##### Volumetrische Bestimmung mit Phosphorwolframsäure.

Der Harn wird in besonders graduierten Röhren (R. Schoeps, Halle a. S.) nach Filtration und Verdünnung bis zum spezifischen Gewicht 1006—1008 bis zur Marke U aufgefüllt, und dann bis zur Marke R das aus Phosphorwolframsäure 1,0 g, Salzsäure (Ac. Hydrochl. purum) 5,0 g, Alkohol (96%) 100,0 ccm bestehende Reagens zugesetzt. Nach 10—15 maligem vorsichtigem Umkehren und 24 stündigem Stehenlassen

<sup>1)</sup> Aufrecht, Deutsche med. Wochenschr. 35. 2018. 1909. — K. Braungard, Chem.-Ztg. 33. 942. 1909.

<sup>2)</sup> P. Rüde, Diss. Greifswald 1905.

kann der Eiweissgehalt an einer Skala abgelesen werden. Bei mehr als 0,6% Eiweiss muss der Harn entsprechend verdünnt werden. Die Methode soll erheblich bessere Werte geben, wie das Esbachsche Verfahren.

Das Reagens fällt nach Tsuchiya aus normalem Harn keinen Niederschlag aus; der Niederschlag in Eiweissharnen setzt sich regelmässig ab, es bilden sich keine Schaumbläschen. Beides sind Vorteile gegenüber dem Esbachschen Reagens.

Nach Engländer ist dieses Verfahren weniger zuverlässig, wie das gewichtsanalytische Verfahren. — Wideroe fand diese Probe genauer und zuverlässiger wie die Esbachsche Methode und namentlich bei minimalen Eiweissmengen noch brauchbar. — Schippers gibt der Esbachschen Methode den Vorzug vor der Probe von Tsuchiya, da letztere oftmals in eiweissfreien Harnen Purinkörperfällungen erzeuge und auch wegen der grobflockigen Fällung den Eiweissgehalt fast stets zu hoch anzeige, auch gehe die Mischung des Harns mit dem Phosphorwolframsäurereagens nur langsam vor sich. — Wolpe lobt das Verfahren sehr, während Pieper meist keine genauen Resultate fand. Tsuchiya<sup>1)</sup> benutzte zunächst die gewöhnlichen Esbachschen Röhrchen. Es hat sich aber gezeigt, dass zur Erzielung einer grösseren Genauigkeit eine besondere Eichung erforderlich ist.

##### 5. Andere Absatzmethoden.

a) Buchner<sup>2)</sup> beschreibt ein Albuminimeter, dessen Konstruktion darauf beruht, dass wenn man filtrierten eiweisshaltigen Harn (8 ccm) zum Sieden erhitzt, dann einige Tropfen Salpetersäure und 2 ccm konzentrierte Kochsalzlösung hinzusetzt, das koagulierte Eiweiss sich in einer Stunde dicht und gleichmässig absetzt, so dass man ähnlich wie bei der Esbachschen Methode aus der Höhe des Niederschlages den Eiweissgehalt an einer empirischen Skala ablesen kann.

Das Verfahren eignet sich nach Buchner für Harne mit 0,1—3% Eiweiss. Nach Engels ist die Methode bei Harnen mit weniger wie 0,3% Eiweiss genauer wie die Esbachsche Methode, bei Harnen mit mehr Eiweiss ungenauer.

b) v. Hoesslin<sup>3)</sup> empfiehlt folgendes Verfahren: 10 ccm Harn werden gekocht, nach Zusatz einiger Tropfen Essigsäure in ein auf 10 ccm geeichtetes Zentrifugierröhrchen gebracht, das in  $\frac{1}{10}$  ccm eingeteilt ist, so dass jeder Teilstrich  $\frac{1}{10}$  ccm entspricht. Der unterste Teil des Röhrchens ist so ausgezogen, dass man noch

<sup>1)</sup> J. Tsuchiya, Zentralbl. f. inn. Med. **29**. 105 und 605. 1908. — M. Engländer, ebenda 265. — Wideroe, Nork Magzin for Laegeridenskapen **69**. 1082. 1908. — J. C. Schippers, Nederl. tijdschr. v. Geneesk. 1909. II. 922. Zentralbl. f. inn. Med. **30**. 1001. 1909. — Wolpe, St. Petersburg med. Wochenschr. 1909. 37. — R. Pieper, Diss. Leipzig 1909.

<sup>2)</sup> G. Buchner, Münch. med. Wochenschr. **53**. 1178. 1906. — W. Engels, ebenda **54**. 1481. 1907.

<sup>3)</sup> R. v. Hösslin, Münchn. med. Wochenschr. **56**. 1673. 1909.

0,01 ccm ablesen kann. Die saure Flüssigkeit wird in diesem Rohre zentrifugiert.  $\frac{1}{10}$  ccm des Niederschlages entspricht nach Kontrollversuchen ungefähr 0,01 % gewichtsanalytisch bestimmtem Eiweiss. Bei grösserem Eiweissgehalt ist der Harn zu verdünnen.

c) Verfahren von C. W. Purey<sup>1)</sup>. 10 ccm Harn werden mit 2 ccm 50 %-iger Essigsäure und 3 ccm einer 10 %-igen Kaliumferrocyanidlösung gemischt, in eine besonders graduierte Röhre eingefüllt und nach 10 Minuten zentrifugiert. Der Prozentsatz wird dann aus dem Volum abgelesen.

d) Verfahren von Rössler<sup>2)</sup>. Harn (bei hohem Eiweissgehalt zu verdünnen) wird vorsichtig auf 5 ccm verdünnte Essigsäure geschichtet, der 3 Tropfen einer von Jolles angegebenen Mischung (Bernsteins. 2,0 g, Sublimat 1,0 g, Kochsalz 0,1 g, Wasser 50 ccm) zugefügt sind. Die Höhe der entstehenden weissen Zone wird mit dem Zirkel gemessen und entspricht dem Eiweissgehalt.

e) Verfahren nach Prescher<sup>3)</sup>. In einem besonders konstruierten Reagenzglas (Eprouvette mit flach trichterförmigem Ansatz) wird die Salpetersäureschichtprobe ausgeführt, aus der Höhe der Zone kann auf den Eiweissgehalt (schwach, mittelstark, stark, sehr stark) geschlossen werden.

### G. Andere indirekte Methoden.

1. Die polarimetrische Bestimmung führt nur zu ungenauen Resultaten, weil der Harn bei Albuminurie in der Regel zwei verschiedene Eiweisskörper mit verschiedener spezifischer Drehung, nämlich  $[\alpha]_D = -63,6$  für das Albumin und  $[\alpha]_D = -47,8$  für das Globulin nebeneinander enthält und weil der Harn Eigendrehung besitzt. Die Grenzen der Fehler, welche durch die Gegenwart dieser zwei Eiweisssubstanzen in einem optisch inaktiven Lösungsmittel bedingt sind, lassen sich von vornherein feststellen. Bezieht man die beobachtete Drehung auf Albumin, so ist die Bestimmung selbstverständlich richtig, wenn die Lösung bloss Albumin enthält; wäre dagegen bloss Globulin zugegen, so fände man für 1 Albumin nur  $\frac{47,8}{63,6} = 0,7516$  Eiweiss, also 24,84 % zu wenig. Der Fehler in der Albuminbestimmung bewegt sich also zwischen 0 und 24,84 %. Es liesse sich nun die Berechnung mit dem Mittel der beiden spezifischen Drehungen,  $-55,7$ , vornehmen; dann würde, wenn die Lösung nur Albumin enthielte, 14,18 % zuviel, und wenn sie bloss Globulin enthielte, 14,18 % Eiweiss zu wenig gefunden; der Fehler liegt also zwischen  $-14,18$  und  $+14,18$  %.

Der eiweissfreie Harn dreht nun gleichfalls links; betrüge die Drehung  $\alpha_D = 0,1$  und berechne man das Eiweiss mit der Drehungskonstante für das Albumin, so fände man 0,16 g und bei der Berechnung mit der mittleren Drehung 0,18 g Eiweiss in 100 ccm zuviel.

Man könnte daran denken, die beiden Eiweisskörper unter Berücksichtigung der Eigendrehung des Harns gesondert polarimetrisch zu bestimmen; allein auch so gelangt man nicht zum Ziele, weil sich nach Hupperts Erfahrungen die Eigendrehung des Harns bei der Abscheidung des Eiweisses ändert und zwar bei den verschiedenen Fällungsweisen in verschiedenem Grade (S. 1153).

2. Die massanalytische Methode von Bödeker beruht darauf, dass Albumin in essigsaurer Lösung durch Ferrocyankalium vollständig gefällt wird. Das Verfahren gibt nach Neubauer nur annähernde Resultate. Auch Thomas<sup>4)</sup>

<sup>1)</sup> C. W. Purey, New York med. Journ. 1899. 17. Juni. Jahresh. f. Tierch. 30. 332. 1900.

<sup>2)</sup> O. Rössler, Deutsche med. Wochenschr. 29. 335. 1903.

<sup>3)</sup> J. Prescher, Chem.-Ztg. 25. 728. 1903.

<sup>4)</sup> Bödeker, Ann. d. Chem. u. Pharm. 111. 195. — L. Thomas, Schmidts Jahrb. 120. 171.



hat gefunden, dass wenn der Eiweissgehalt nicht 1,5—2 % beträgt, die Resultate gänzlich unbrauchbar sind. In allen Fällen, wo der Eiweissgehalt nur gering war, fand Thomas nach Bôdekers Methode oft sehr viel mehr Eiweiss als durch Wägung.

3. Tanret verwendet zur Bestimmung des Eiweisses eine Lösung von 3,32 g Jodkalium und 1,35 g Quecksilberchlorid in 100 ccm Wasser (S. 1119). Es werden 10 ccm Harn mit 2 ccm Essigsäure vermischt und das Reagens der Flüssigkeit tropfenweise zugesetzt. Sobald der Niederschlag bleibend wird, prüft man von Zeit zu Zeit, ob ein Tropfen derselben auf einer Porzellanplatte mit einem Tropfen 1 %-iger Quecksilberchloridlösung einen gelben Niederschlag gibt; geschieht dies, so ist die Fällung vollendet. Von der verbrauchten Tropfenzahl zieht man 3 ab; so viel Tropfen übrig bleiben, so viel mal 0,5 g Eiweiss ist im Liter enthalten. Das Reagens fällt ausser Eiweiss auch andere Harnbestandteile. Stephen<sup>1)</sup> hat das Verfahren aufs Neue vorgeschlagen.

Venturoli<sup>2)</sup> verwendet dasselbe Prinzip in anderer Form. Er versetzt 5 ccm Harn mit 6 ccm einer 0,5 %-igen Jodkaliumlösung als Indikator und einem Tropfen Essigsäure und titriert dann mit einer 1 %-igen Quecksilberchloridlösung bis zum Auftreten eines gelbten Niederschlags von Quecksilberjodid. Von den bis dahin verbrauchten ccm Quecksilberlösung wird 1 ccm abgezogen; der Rest gibt, mit dem empirischen Faktor 0,0245 multipliziert, die Menge des Eiweiss in g.

4. Klug<sup>3)</sup> bestimmt den Gehalt einer Eiweisslösung oder Harn durch spektrophotometrische Messung der Biuretfarbung. Es sollen 4 ccm der Lösung mit 2 ccm konzentrierter Natronlauge und 4 Tropfen 10 %-iger Kupfersulfatlösung versetzt und die Mischung filtriert werden; die Spektrophotometrie wird in der Spektralgegend D 75 E — E vorgenommen. Klug hat die Extinktionskoeffizienten für verschiedene Eiweissarten angegeben.

5. Verfahren von Jolles<sup>4)</sup>. Das Verfahren beruht auf der Voraussetzung, dass durch Oxydation mit Permanganat in saurer Lösung der Stickstoff der Eiweissstoffe in eine Form übergeführt wird, dass er bei der Behandlung mit unterbromigsaurem Natrium als Gas entwickelt wird. Es wird das Eiweiss zunächst durch Koagulation in der Hitze mit Essigsäure und Kochsalz abgetrennt und dann das Koagulum der Oxydation unterworfen. Das Gewicht des entwickelten Stickstoffs mit 7,68 multipliziert ergibt die Menge des Eiweiss. Die Angaben von Jolles über das Verhalten des Eiweiss bei der Oxydation mit Permanganat in saurer Lösung haben sich als irrig herausgestellt. Es sind damit die Voraussetzungen, auf denen diese Methode beruht, hinfällig geworden.

6. Verfahren von Denigès<sup>5)</sup>. Das Verfahren von Denigès beruht auf folgender empirischer Grundlage. Fügt man zu 10 ccm  $\frac{1}{10}$  n-KCN-Lösung 10 ccm Kaliumquecksilberjodidreagens, ferner 10 ccm  $\text{NH}_3$ , 100 ccm Wasser und dann tropfenweise  $\frac{1}{10}$  n- $\text{AgNO}_3$ -Lösung, so tritt erst bei Zusatz von 4,8 ccm  $\text{AgNO}_3$ -Lösung eine bleibende Trübung von AgJ auf. Fügt man zu einer Eiweisslösung bei essigsaurer Reaktion das Kaliumquecksilberjodidreagens, filtriert von dem Eiweissniederschlag ab, setzt dann Kaliumcyanidlösung und  $\text{NH}_3$  hinzu und titriert

<sup>1)</sup> Ch. Tanret, Bull. de thérap. 7. 1877; Zentralbl. f. d. med. Wissenschaft. 1877. 493. — N. Stephen, Lancet 1882. II. Nr. 15; Ztschr. f. analyt. Ch. 23. 116.

<sup>2)</sup> F. Venturoli, L'Orosi 13. 255. Chem. Zentralbl. 1890. 2. 525.

<sup>3)</sup> F. Klug, Zentralbl. f. Physiologie 8. 227. 1893.

<sup>4)</sup> A. Jolles, Monatsh. d. Chem. 23. 589. 1902; Ztschr. f. analyt. Ch. 41. 589. 1903.

<sup>5)</sup> G. Denigès, J. Pharm. Chim. [6] 10. 117. 1899.

nunmehr mit  $\text{AgNO}_3$ -Lösung, so tritt schon früher wie bei 4,8 ccm die Jodidtrübung auf. Aus der Differenz der gefundenen Werte lässt sich auf empirischer Grundlage die Eiweissmenge berechnen. Eine praktische Verwendung und Prüfung hat diese Methode nicht erfahren.

7. Kohler versuchte durch Bestimmung der Leitfähigkeit bei verschiedenen Graden der Verdünnung nach dem Vorschlag von Wasmuth<sup>1)</sup> den Eiweissgehalt des Harns festzustellen und erhielt ähnliche Werte wie nach Esbach.

## II. Gesonderte Bestimmung des Globulins und Albumins.

### 1. Nach Hammarsten<sup>2)</sup>.

A. Prinzip. Sättigt man Harn bei amphoterer oder besser schwach alkalischer Reaktion mit Magnesiumsulfat, so fällt alles Globulin aus (S. 1159). Der Niederschlag wird mit gesättigter Magnesiumsulfatlösung albuminfrei gewaschen, zur Koagulation des Globulins auf  $110^\circ$  erhitzt, vom Magnesiumsulfat durch Waschen befreit, getrocknet, verascht und das Gewicht der Asche vom Trockengewicht abgezogen. Bestimmt man in einer Probe zugleich das Gesamteiweiss, so lässt sich auch der Gehalt des Harns an Albumin berechnen. Von Hammarsten ausgeführte Kontrollbestimmungen ergaben sehr befriedigende Resultate, aus Harn wird jedoch nach Mörner<sup>3)</sup> beim Sättigen desselben mit Magnesiumsulfat ein Teil des Albumins als mucin-ähnliche Substanz gefällt.

Wurde reines Serumalbumin, welches durch Sättigen seiner Lösung mit Magnesiumsulfat bei  $30^\circ$  nicht gefällt wurde, neutralem oder schwach alkalischem Harn zugesetzt, so wurde es durch das Bittersalz niedergeschlagen, bei einem Gehalt des Harns von 0,06 % Albumin vollständig, nach Zusatz von 0,17 % zum grössten Teil. Aus einem bei Phosphorvergiftung entleerten Harn konnten so selbst 0,55 % Eiweiss bis auf eine geringe Menge gefällt werden.

B. Ausführung. Der Harn darf nicht stark sauer reagieren, weil in diesem Fall nach Ott<sup>4)</sup> durch das Magnesiumsulfat, noch leichter in der Wärme als in der Kälte, auch Albumin gefällt und die Bestimmung falsch wird. Man versetzt daher den Harn bis zum Verschwinden der sauren Reaktion mit Natron- oder Kalilauge, lässt einige Zeit stehen und filtriert einen entstandenen Phosphatniederschlag ab. Ist der Harn reich an Uraten, so kühlt man ihn nach Hammarsten vorher einige Stunden auf  $+2$  oder  $+1^\circ$  ab und filtriert von den ausgefallenen Uraten ab. Von dem so vorbereiteten Harn misst man je nach dem Eiweissgehalt 25–100 ccm in ein Becherglas ab, versetzt ihn auf 100 ccm mit 120 g fein gepulvertem und gesiebten krystallisierten Magnesiumsulfat und lässt ihn unter häufigem Umrühren stehen, bis sich das am Boden liegende Salz ganz oder bis auf einen kleinen gleichbleibenden Rest gelöst hat. In der Kälte sind dazu

<sup>1)</sup> R. Kohler, Ztschr. f. klin. Med. **65**. 135. 1908. -- A. Wasmuth, Sitzungsber. Kais. Akad. d. Wissensch. Wien. Math.-naturw. Klasse III. **114**. 83. 1906.

<sup>2)</sup> O. Hammarsten, Pflügers Archiv **17**. 431 u. 447; **22**. 437 u. briefliche Mitteilung.

<sup>3)</sup> K. A. H. Mörner, Skandin. Archiv **6**. 411. 1895.

<sup>4)</sup> Ad. Ott, Prager med. Wochenschr 1884. 153.

mehr als 24 Stunden erforderlich, in der Wärme, bei 40° (in einem Wasserbad) geht die Lösung des Salzes schneller von statten; eine warm gesättigte Lösung muss man vor dem Filtrieren erkalten lassen, damit überschüssig gelöstes Salz auskristallisiert. Beim Umrühren ist die Bildung von Schaum möglichst zu vermeiden.

Nach erfolgter Sättigung des Harns mit dem Salz bringt man die Flüssigkeit mit den Globulinflocken auf ein aschefreies, bei 110° (in einem leeren Glaswolltrichter) getrocknetes, gewogenes Filter, das vorher mit gesättigter Bittersalzlösung befeuchtet worden ist, rührt dann das rückständige Salz wiederholt mit gesättigter Bittersalzlösung auf und bringt auch diese Lösung auf das Filter, bis die Magnesiumsulfatlösung nach dem Verrühren mit dem Salzbodensatz klar bleibt. Das Filter darf dabei nicht bis zum Rande gefüllt werden. Man wäscht darauf das Filter so lange mit gesättigter Bittersalzlösung, bis das Filtrat weder bei Erhitzen für sich, noch unter Zusatz von Essigsäure getrübt wird, und stellt den Trichter samt dem Filter mehrere Stunden in einen auf 110° angeheizten Trockenkasten, wäscht das Filter erst mit heissem Wasser schwefelsäurefrei, dann noch mit Alkohol und Äther, trocknet es bei 110° bis zur Gewichtskonstanz und wägt es nach dem Erkalten im Exsiccator. Es ist dann noch die dem Niederschlag beigemengte Mineralsubstanz zu bestimmen; zu diesem Zwecke brennt man Filter samt Niederschlag in einem gewogenen Platintiegel weiss und wägt nach dem Erkalten im Exsiccator. — Bei dem Verfahren tritt leicht die unangenehme Störung ein, dass sich das Filter beim Auswaschen mit der gesättigten Bittersalzlösung durch auskristallisierendes Salz völlig verstopft, wodurch die Analyse verloren geht.

Kamenski<sup>1)</sup> löst den ausgewaschenen Niederschlag in Wasser und koaguliert das Globulin durch Kochen.

## 2. Nach Pohl.

A. Prinzip. Pohl<sup>2)</sup> fällt das Globulin dadurch, dass er den Harn zur Hälfte mit Ammonsulfat sättigt (S. 1159), wobei Albumin nach Mörner zwar auch, aber nicht so vollständig wie bei Sättigen des Harns mit Magnesiumsulfat, als mucinähnliche Substanz gefällt wird. Der Niederschlag wird wieder mit halbgesättigter Ammonsulfatlösung albuminfrei gewaschen, im übrigen aber nach Hammarsten (S. 1150) verfahren. Die Resultate zeigen eine befriedigende Übereinstimmung mit den nach dem Hammarstensen Verfahren gewonnenen. Ein Verstopfen des Filters durch auskristallisierendes Salz, was bei dem Hammarstensen Verfahren leicht vorkommt, tritt hier nicht ein.

B. Ausführung. Es wird Harn mit Ammoniak bis zum Verschwinden der sauren Reaktion versetzt und wenn nötig von einem entstandenen Phosphatniederschlag abfiltriert. Von dem Filtrat versetzt man 50–100 ccm mit dem gleichen Volumen einer gesättigten neutralen Ammonsulfatlösung, bringt den Niederschlag nach einstündigem Stehen auf ein (im leeren Glaswolltrichter) gewogenes, bei 110° getrocknetes und nach dem Erkalten gewogenes Filter aus aschefreiem

<sup>1)</sup> Kamenski, Diss. Petersburg 1888; Chem. Zentralbl. 1888. 931.

<sup>2)</sup> J. Pohl, Archiv f. exper. Pathol. 20. 426. 1886.



Papier und wäscht mit halbgesättigter (auf das doppelte Volumen verdünnter gesättigter) Ammonsulfatlösung, bis im Filtrat mit Essigsäure und Ferrocyankalium kein Eiweiss mehr nachweisbar ist. Von da ist das Verfahren dasselbe wie bei Hammarsten (S. 1150).

### 3. Das Verfahren von Oswald<sup>1)</sup>.

Man bestimmt in einem Esbachschen Albuminimeter zunächst die Gesamteiweissmenge mittels des Esbachschen Reagens. In einem 2., 3. und 4. Albuminimeter wird zunächst Harn bis zur U-Marke eingefüllt und dann in das 2. Albuminimeter gesättigte Ammoniumsulfatlösung im Verhältnis 2,8 zu 7,2 Harn aus der Bürette hinzugefügt (zur Ausfällung von Fibrinogen), in dem 3. Albuminimeter wird konzentrierte Ammoniumsulfatlösung im Verhältnis 3,6 zu 6,4 Harn (Euglobulinfraktion), in dem 4. Albuminimeter 5:5 (Pseudoglobulinfraktion) hinzugegeben. Um die richtigen Mengenverhältnisse berechnen zu können, wird in die einzelnen Albuminimeter der Harn aus der Bürette bis zur U-Marke abgemessen, und dann die zuzusetzende Menge konzentrierter Ammoniumsulfatlösung für die einzelnen Albuminimeter berechnet. Die einzelnen Apparate werden nach dem Zusatz der Ammoniumsulfatlösung umgeschüttelt und mehrere Stunden stehen gelassen. Die Flüssigkeiten werden dann von dem Niederschlag entweder durch Abhebern oder durch Filtration getrennt. Die Niederschläge werden dann in Wasser (zweckmässig unter Zusatz von etwas Natriumcarbonat) gelöst, die Lösungen in den gleichen Apparaten, in denen die Ausfällung vorgenommen war, bis zur U-Marke aufgefüllt und dann mit Esbachschem Reagens bis zur R-Marke gefüllt. Man erhält auf diese Weise 4 Esbach-Werte. Das 1. Albuminimeter zeigt das Gesamteiweiss an. Das 2. Albuminimeter den an Fibrinogen bzw. Fibrinoglobulin. Der Eiweissgehalt im 3. Apparat minus dem des 2. ergibt das Euglobulin; der des 4. Apparates minus dem des 3. das Pseudoglobulin, der des 1. Apparates minus dem des 4. das Albumin.

Nach dem früher über die Esbachsche Methode Gesagtem kann diese Fraktionierung ebenfalls höchstens annähernde Vergleichswerte liefern.

### 4. Mittels der Hellerschen Eiweissprobe.

Lecorché und Talamon<sup>2)</sup> wenden zur Bestimmung des Globulins im Harn dasselbe Verfahren an, dessen sich Roberts, Stol-

<sup>1)</sup> A. Oswald, Münchn. med. Wochenschr. 51. 1514. 1904.

<sup>2)</sup> E. Lecorché u. Ch. Talamon, Traité de l'albuminurie, Paris 1888. 67.

nikoff, sowie Brandberg zur Bestimmung des Gesamteiweisses bedient haben (S. 1137). Sie sättigen den Harn mit Magnesiumsulfat und verwenden das Filtrat zur Bestimmung des in Lösung gebliebenen Albumins. Die Menge desselben wird abgezogen von der Menge des nach Brandberg bestimmten Gesamteiweisses. Es war die Frage, ob die starke Erhöhung des Salzgehaltes die Richtigkeit des Resultats nicht beeinträchtigt. v. Ritter hat in Hupperts Laboratorium in 10 fach verdünntem Harn ohne und mit Zusatz von soviel Ammonsulfat, als der unverdünnte Harn zur Fällung des Globulins gebraucht hätte, das Eiweiss nach Brandberg bestimmt und dieselben Werte erhalten.

Ob es zulässig ist, die Menge des Albumins nach derselben Formel zu berechnen wie die des Gesamteiweisses, ist fraglich, aber nicht unwahrscheinlich.

#### 5. Bestimmung durch das Polarimeter.

Man könnte so verfahren, dass man die Drehung des Harns bestimmt, dann das Globulin nach II. 1 oder 2 abscheidet und die Drehung des Filtrats ermittelt und endlich aus dem Filtrat oder aus einer anderen Harnprobe das gesamte Eiweiss abscheidet und in dem eiweissfreien Harn die Eigendrehung bestimmt. Es wäre dann unter Berücksichtigung der Volumensänderungen mit Hilfe der Drehungskonstanten des Albumins und des Globulins die Menge der beiden Eiweisssubstanzen zu berechnen. Das Verfahren scheitert aber daran, dass sich die Eigendrehung des Harns bei den verschiedenen Fällungsweisen der Eiweisskörper in verschiedenem Grade ändert, ein Umstand, der bei der Kleinheit der im Eiweiss-harn zur Beobachtung kommenden Drehungen die Richtigkeit der Resultate in erheblicher Weise beeinflusst (s. S. 1148).

## II. Globuline.

Allgemeines. Unter dem Namen Globuline werden eine Anzahl von durch Erhitzen ihrer wässerigen Lösung koagulierbaren Proteinen zusammengefasst, die als sichere gemeinsame Eigenschaft die Unlöslichkeit in halbgesättigter Ammoniumsulfatlösung haben. Die Globuline sind löslich in verdünnten Lösungen neutraler Salze, wie  $\text{NaCl}$ ,  $\text{MgSO}_4$ ,  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , sowie in Alkalien und stark verdünnten Säuren. Ursprünglich hat man noch als zweites gemeinsames Merkmal die Unlöslichkeit in destilliertem Wasser angegeben. Die Unlöslichkeit in salzfreiem Wasser lässt

sich dadurch dokumentieren, dass aus einer Lösung von Globulin in verdünnter Salzlösung Globulin ausfällt, wenn man durch Dialyse den Salzgehalt herabsetzt. Auch gelingt es bei geeigneten Konzentrationsverhältnissen, wenn man die Globulinlösung mit destilliertem Wasser stärker verdünnt, Globulin zur Ausfällung zu bringen.

Es hat sich aber herausgestellt, dass insbesondere beim Bluts serum aus der durch Halbsättigung mit Ammoniumsulfat (oder auf andere Weise) gewonnenen Gesamtglobulinmenge durch Dialyse nur ein Teil des Eiweisses zum Ausfallen gebracht werden kann (Marcus, Pick, Fuld und Spiro, Freund und Joachim). Man hat den bei der Dialyse ausfallenden Teil als Euglobulin, den nicht ausfallenden Teil als Pseudoglobulin bezeichnet. Es ist aber doch fraglich, ob in dieser Weise wirklich zwei verschiedene Eiweisskörper voneinander getrennt worden sind, denn Hammarsten und Taylor weisen darauf hin, dass durch geeignete Reinigungen das Euglobulin wenigstens zum Teil wieder zu Pseudoglobulin wird und umgekehrt. Auch die von Spiro und Fuld, bzw. von Spiro und Porges<sup>1)</sup> durchgeführte Fraktionierung der bei Halbsättigung mit Ammoniumsulfat gewonnenen Serumglobuline in drei Fraktionen (Fällungsgrenzen 28—36, 33—42, 40—46 Vol.-Proz.) hat nicht einwandfrei ergeben, dass es sich hierbei um einheitliche chemische Individuen handelt, zumal auch diese Fraktionen sich durch Dialyse wieder zerlegen lassen in demselben Sinne wie das Gesamtglobulin.

Vom Globulin verschieden, vor allem durch die Eigenschaft der Gerinnbarkeit durch das Fibrinferment, ist das Fibrinogen, das man im allgemeinen auch zu den Globulinen rechnet (über dessen Eigenschaften etc. s. bei Fibrinausscheidung).

#### 1. Serumglobulin (Paraglobulin, fibrinoplastische Substanz älterer Autoren).

A. Vorkommen. Im Harn findet sich das Globulin fast stets als Begleiter des Albumins, und zwar bei jeder Art von Albuminurie. In Ausnahmefällen haben Hammarsten, F. A. Hoffmann, F. D. Boyd, J. Strauss neben Albumin kaum sicher nachweisbare Spuren von Globulin im Harn gefunden (Serinurie), oder noch seltener nur Globulin und kein Serumalbumin (Hammarsten, Werner,

<sup>1)</sup> E. Markus, Zeitschr. f. physiol. Ch. 28. 559. 1899. — E. P. Pick, Hofmeisters Beiträge 1. 351 u. 393. 1901. — E. Fuld und K. Spiro, Zeitschr. f. physiol. Ch. 31. 132. 1900. — E. Freund und J. Joachim, Ebenda 36. 407. 1902. — O. Hammarsten s. Cohnheim, Chemie der Eiweissstoffe II. Aufl. Seite 169. — A. E. Taylor, Journ. of biol. chem. 1. 345. 1906. — K. Spiro, Hofmeisters Beiträge 1. 78. 1902. — K. Spiro und O. Porges, Ebenda 3. 277. 1902.



Maguire, Larroche, Chauffard und Gourand) (Globinurie). Dementsprechend wechselt das Verhältnis zwischen Globulin und Serumalbumin im Harn ganz ausserordentlich; als Grenzwerte fand Hammarsten 8,13 und 60,24% des Gesamteiweisses an Globulin, oder die Menge Albumin, welche auf 1 Globulin kam, bewegte sich zwischen 0,66 und 11,2; zu ähnlichen Erfahrungen über die Grösse dieses „Eiweissquotienten“ gelangten in sehr zahlreichen Bestimmungen Hoffmann, Czatóry, sowie Patella und viele andere<sup>1)</sup>. Gewöhnlich enthält der nephritische Harn mehr Serumalbumin wie Globulin, so dass der Eiweissquotient im allgemeinen 1,5—2,3 beträgt. Es ist zu bedenken, dass die getrennte Bestimmung von Serin und Globulin nur grobe Annäherungswerte liefert.

Bei Nephritis fand Hoffmann den Quotienten im Mittel zu 4,5, mit den Grenzwerten 0,61 und 13,0, Czatóry die Grenzwerte 0,44 und 7,23. Bei anderen Formen der Albuminurie ergaben sich ähnliche Verhältnisse. Die Erfahrungen von Hoffmann und Czatóry ergaben übereinstimmend, dass bei Besserung der Nephritis die relative Menge des Globulins abnimmt. Czatóry hat bei der genuinen Schrumpfniere und bei der Stauungsalbuminurie (Herzfehler) die höchsten Werte für den Quotienten (28,1 und 53,2) gefunden; ferner bei der amyloiden Degeneration bei höchstem Eiweissgehalt (bis 3,3%) den Quotienten meist unter 1,0, also relativ sehr viel Globulin. Nach Patella wird bei der Pneumonie viel, beim Typhus wenig Globulin ausgeschieden. Bei Schrumpfniere überwiegt im allgemeinen das Serin stark. Czatóry sucht hierfür in der Höhe des Blutdruckes und der Stromgeschwindigkeit die Erklärung, während neuere Autoren (Cloetta, Dreser, Lommel)<sup>2)</sup> auf die Beschaffenheit der filtrierenden Membran den Hauptwert legen.

Bestimmte Beziehungen zwischen dem Mischungsverhältnis beider Eiweisskörper im Blute einerseits und im Harn andererseits haben sich nicht ergeben (Czatóry, Noel Paton, Cloetta, Erben)<sup>3)</sup>.

Bei Amyloidentartung der Nieren ist häufig ein Überwiegen des Globulins gegenüber dem Albumin im Harn zu beobachten (Senator, Reale, Erben, Joachim, Jack und Necker), jedoch liegen auch gegenteilige Befunde vor (Petri, Noel Paton)<sup>4)</sup>.

<sup>1)</sup> Wegen der einschlägigen Literatur siehe von Noorden, Handb. d. Pathol. d. Stoffwechsels II. Aufl. 1. 1009. 1906. — O. Hammarsten, Private Mitteilung an Huppert. — F. A. Hoffmann, Virchows Archiv 89. 271. 1882. — Fr. D. Boyd, Edinb. med. Journ. 1894. May. — J. Strauss, Diss. Strassburg 1895. — Marguire, Lancet 1886. 1062 u. 1106. — J. Larroche, Echo méd. de Toulouse 1902 [2] 78. — Chauffard und Gourand, Zentralbl. f. Harn- u. Sexualorg. 12. 643. 1901. — A. Czatóry, Archiv f. klin. Med. 47. 159. 48. 358. 1891. — S. Patella, Ann. di chim. e farmacol. 8. 190. 1888; Maly 18. 30. 1888.

<sup>2)</sup> Cloetta, Archiv f. exper. Pathol. u. Pharm. 42. 453. 1899; 48. 223. 1902. — A. Dreser, Verhandl. Gesellsch. deutsch. Naturf. u. Ärzte 74. I. 254. 1903. — F. Lommel, Deutsches Archiv f. klin. Med. 78. 254. 1903.

<sup>3)</sup> Noel Paton, Brit. Med. Journ. 1890. II. 26. July. — Erben, Zeitschr. f. klin. Med. 50. 441. 1903.

<sup>4)</sup> H. Senator, Virchows Archiv 60. 476. 1874. — E. Reale, La nuova clinica terap. 6. Nr. 7. 1903. — Wiener med. Wochenschr. 1904. 1411. — Erben, l. c. — J. Joachim, Pflügers Archiv 93. 558. 1903. — E. Jack und Fr. Necker, Arch. f. klin. Med. 88. 542. 1907. — Petri, Zur Chemie des Eiweissarns. Diss. Berlin 1876. — Noel Paton l. c.

Das Globulin des eiweisshaltigen Harns ist ohne Zweifel, wenigstens der Hauptmenge nach, das Serum- oder Paraglobulin. Über Ergebnisse der „biologischen Untersuchung“ s. bei Albumin (S. 1123). Einige Tatsachen lassen aber auch die gleichzeitige Gegenwart noch eines anderen Globulins, wahrscheinlich des Fibrinogens als nicht unwahrscheinlich erscheinen (s. auch bei Fibrinogen).

Sicher ist das Fibrinogen in solchen Harnen in gelöster Form enthalten gewesen, welche einige Zeit nach der Entleerung Fibrin abgeschieden haben. Auf das wenigstens zeitweilige Vorkommen von nicht spontan gerinnendem Fibrinogen in Eiweiss-harnen scheint die niedere Koagulationstemperatur mancher derselben hinzuweisen. Gerhardt sah Eiweiss-harn schon bei 56° gerinnen, Brunton und Power bei 55,6°, Temperaturen, welche in auffälliger Weise mit dem Koagulationspunkt des Fibrinogens zusammenfallen (vgl. S. 1161); Führy-Snethlage schied aus Eiweiss-harn die Hauptmenge der Globuline durch Dialyse ab und fand, dass die rückständige (noch globulinhaltige) Eiweisslösung bei 36—55° gerann und, nachdem sie mit Wasser verdünnt worden war, bei 51—58°. In Zusammenhang hiermit steht die weitere Beobachtung Gerhardts, nämlich dass Eiweiss-harn manchmal zwei verschiedene Gerinnungstemperaturen zeigt (S. 1102). Bei seinen Versuchen, das Globulin durch Ammonsulfat aus dem Harn zu fällen, sah Pohl<sup>1)</sup> diese Fällung einmal schon nach Zusatz von 0,6 Vol. gesättigter Ammonsulfatlösung eintreten, während das Serumglobulin Zusatz des gleichen Volumens der Salzlösung fordert. Von näher bekannten Globulinen besitzt nur noch das Myosin einen so niederen Koagulationspunkt wie das Fibrinogen. Das Vorkommen des Fibrinogens im Harn ist wahrscheinlicher, als das des Myosins, weil das Fibrinogen einen Bestandteil des Plasmas bildet, und wäre analog dem Vorkommen von Fibrinogen in der Hydroceleflüssigkeit.

Es darf dabei nicht ausser acht gelassen werden, dass der Gehalt der Lösung an Neutralsalz einen grossen Einfluss auf die Koagulationstemperatur ausübt (S. 1085), ferner, dass es Serumalbumine von verschiedenen Koagulationspunkten gibt (S. 1101), und dass sich die Heteroalbumose sowie der Bence-Jones'sche Eiweisskörper des Harns ganz (s. dort), der auch im normalen Harn enthaltene mucinähnliche Körper in manchen Stücken wie ein Globulin verhält.

B. Eigenschaften. 1. Globulin ist amorph; Versuche, nach der Ammonsulfatmethode Krystalle zu gewinnen, waren negativ. Über die Löslichkeit in destilliertem Wasser siehe vorher (S. 1084).

Die Lösungen des Globulin (2 und 3) lenken die Ebene des polarisierten Lichtes nach links ab und diffundieren durch Pergamentpapier nicht. Für das Paraglobulin in Salzlösung ist nach Frédéricq  $[\alpha]_D = -47,8^0$  bis  $-48,2^0$ . Die Koagulationstemperatur in 10%iger NaCl-Lösung liegt unscharf zwischen 69—76°. Die Goldzahl liegt bei 0,02—0,05 (Schulz und Zsigmondy)<sup>2)</sup>.

Frédéricq's Bestimmungen beziehen sich auf das Serumglobulin in Salzwasser aus dem Serum vom Rind, Pferd, Kaninchen und Hund. Hammarsten fand die spezifische Drehung ungefähr zu  $-47^0$ . Haas<sup>3)</sup> bestimmte sie für Serumglobulin in verdünntem Natroncarbonat zu  $-59,8^0$ .

<sup>1)</sup> C. Gerhardt, Arch. f. klin. Redic. 5. 214. — Landes Brunton n. d'Arcy Power, St. Bartholomeus Hosp. Reports. 13. 284. Führy-Snethlage, Arch. f. klin. Med. 17. 418. 1876 — J. Pohl, Archiv f. exper. Pathol. 20. 432.

<sup>2)</sup> L. Frédéricq, Archives de Biol. 1. 462. 1880. 2. 379. 1881. — Fr. N. Schulz und R. Zsigmondy, Hofmeisters Beiträge 3. 138. 1901.

<sup>3)</sup> O. Hammarsten, Zeitschr. f. physiol. Ch. 9. 499. 1885. — Haas, Pflügers Archiv 12. 405. 1876.

Die Gerinnungstemperatur des Serumglobulins schwankt zwischen 68—80°. Bei geringem Gehalt an Globulin sowie an Salz und bei raschem Erhitzen ist dieselbe am höchsten. Hoher Salzgehalt setzt die Koagulationstemperatur herab (Limbourg)<sup>1)</sup>.

2. Sie lösen sich in Neutralsalzlösungen, ihre Löslichkeit in Salzlösungen hängt aber ab von der Konzentration der Salzlösung und von der Art des gelösten Salzes.

In Kochsalzlösung von 5—10% lösen sich die Globuline leicht, weniger leicht in schwächeren oder konzentrierteren; wird eine Kochsalzlösung der angegebenen Konzentration, welche reichlich Globulin gelöst enthält, mit Wasser stark verdünnt (auf das 10—20fache und darüber), so lässt sie Globulin ausfallen; ebenso scheidet sich Globulin ab, wenn in der globulinhaltigen Salzlösung noch mehr Kochsalz gelöst wird. Entfernt man aus einer Globulinlösung das lösende Salz durch Dialyse, so fällt gleichfalls Globulin aus.

Neutralsalze fallen bei einer gewissen Konzentration das in verdünnten Neutralsalzlösungen gelöste Globulin. Globulin wird durch Sättigen der Lösung mit NaCl unvollständig, mit Magnesiumsulfat fast vollständig gefällt. Halbe Sättigung mit Ammoniumsulfat oder mit Zinksulfat fällt das Globulin vollständig (Zusatz des gleichen Volum der konzentrierten Salzlösung zu der Eiweisslösung). Die Fällungsgrenzen des Serumglobulins für neutrales Ammoniumsulfat liegen bei 2,9 und 4,6, d. h. wenn eine Globulinlösung in 10 ccm so viel Ammoniumsulfat enthält, wie in 2,9 ccm konzentrierter Ammoniumsulfatlösung enthalten ist, so beginnt eine Globulinfällung, die zunimmt bis zu einem Gehalt entsprechend 4,6 ccm konzentrierter Ammoniumsulfatlösung in 10 ccm.

3. Die Globuline lösen sich in verdünnten Alkalihydraten, in den Lösungen der kohlensauren Alkalien und des einfach sauren (und normalen) Alkaliphosphats; aus diesen Lösungen werden sie durch Säuren, auch durch Kohlensäure, wieder unverändert gefällt, aber nur unvollständig, weil das entstehende Salz noch Globulin in Lösung hält. Auch eine von zweifach saurem Phosphat schwach sauer reagierende Globulinlösung gibt mit Kohlensäure einen Niederschlag. — Alkohol fällt die Lösung gleichfalls; der Niederschlag wird bei längerem Verweilen unter Alkohol unlöslich.

Ebenso lösen sich die Globuline leicht in verdünnten Säuren, nicht so leicht, aber gleichfalls auch in Kohlensäure; in Berührung mit der Säure werden sie aber schnell in Acidalbumin (S. 1105) umgewandelt.

Leitet man in eine Lösung von Globulin in sehr wenig Alkali Kohlensäure, so entsteht alsbald ein Niederschlag; dieser Niederschlag löst sich leicht und vollständig in Salzwasser. Bei weiterem Einleiten von Kohlensäure geht dieses Globulin wieder teilweise in Lösung; lässt man aus der Lösung die Kohlensäure abdunsten, so fällt die in Lösung gegangene Substanz aus, hat aber nun ihre Löslichkeit in Salzwasser verloren.

Auch aus seinen Lösungen in Neutralsalzlösungen kann das Globulin durch Säuren (auch Kohlensäure) gefällt werden; der Niederschlag ist aber kein Globulin mehr, sondern Acidalbumin.

Das Globulin ist durch Kohlensäure auch aus Harn fällbar. Da das Globulin durch Kohlensäure in Acidalbumin verwandelt wird, so könnte es geschehen, dass bei stundenlangem Einleiten von Kohlensäure in den Harn der Niederschlag

<sup>1)</sup> R. Limbourg, Zeitschr. f. physiol. Ch. 13. 450. 1889.



nicht mehr ganz in Neutralsalzen löslich wäre, ohne dass man deshalb Grund zu der Annahme hätte, es sei im Harn schon ursprünglich Acidalbumin enthalten gewesen.

Eine Lösung von Globulin in der gerade erforderlichen Menge von Natriumcarbonat gibt mit einer (schwach alkalischen) wässerigen Albumoselösung nach Kutscher<sup>1)</sup> einen Niederschlag, welcher sich in überschüssigem Alkali und in Säure löst. Desgleichen entstehen Fällungen mit Histon, Nuclein, Nucleoalbumin, Protaminen.

4. Mit Säuren oder Alkalien erwärmt entstehen echte Acid- bzw. Alkaliglobulinate. Die Umwandlung erfolgt sehr leicht durch Alkalien, relativ langsam durch Säuren.

Beim Erhitzen mit Wasser liefert das Globulin nach Mörner<sup>2)</sup> eine dem tierischen Gummi ähnliche, aber stickstoffhaltige Substanz (vgl. S. 466), welche beim Erwärmen mit 3—5% Salzsäure auf dem Wasserbad einen Körper gibt, der Kupferhydrat in alkalischer Lösung reduziert, Wismutoxyd dagegen nicht oder nur schwach, optisch inaktiv ist und ein bei 170—172° schmelzendes Osazon bildet. Diese zuckerähnliche Substanz wird auch direkt aus dem Globulin beim Erwärmen mit Salzsäure erhalten.

5. Die Globuline geben die gleichen Farbenreaktionen wie die Albumine (s. dort). Auch die zum Nachweis des Albumins beschriebenen Fällungsreagentien zeigen ebenso Globulin an.

C. Nachweis. Neben Albumin in Lösung befindliches Globulin lässt sich nur dadurch nachweisen, dass man es von dem Albumin trennt:

Man hat sich dazu verschiedener Methoden bedient.

a) Das am frühesten angewandte, aber sehr mangelhafte Verfahren bestand darin, dass man den Harn mit Wasser bis zur Dichte von 1,002—1,003 verdünnte (einen Harn von 1,012 also auf das 6- oder 4fache) und vorsichtig mit stark verdünnter Essigsäure versetzte oder in denselben längere Zeit Kohlensäure einleitete. J. C. Lehmann<sup>3)</sup> war der erste, welcher nachwies, dass der durch Kohlensäure in einem Eiweissarn entstehende Niederschlag aus Globulin besteht. Öfter trübt sich der Harn schon beim Verdünnen; die Trübung wird durch die Behandlung mit Säure stärker, aber nur in seltenen Fällen setzt sich aus dem Harn auch bei stunden- und tagelangem Stehen so viel Niederschlag ab, dass er von der Flüssigkeit getrennt werden kann. Harnsäure ist in dem Niederschlag aber nicht enthalten (Lehmann). — Mittelst dieser Methode kann aus dem Harn wegen der lösenden Wirkung der Harnsalze nur ein kleiner Bruchteil des in ihm enthaltenen Globulins gewonnen werden.

b) Eine viel bessere Ausbeute an Globulin gewährt die Dialyse in Pergamentpapierschläuchen (Heynsius, Führy-Snethlage)<sup>4)</sup>; das Verfahren ist aber umständlich und verbraucht viel Zeit; auch schliesst es eine Verunreinigung des Globulins mit Heteroalbumose, wenn diese zugleich vorhanden wäre, nicht aus.

Das Globulin beginnt sich aus dem Harn in Flocken oder auch als eine dünne, dem Papier fest anliegende Schicht abzuscheiden, wenn der Salzgehalt des Harns auf eine gewisse untere Grenze gesunken ist, und die Abscheidung des Globulins schreitet in dem Masse fort, als die Salze entfernt werden; das Albumin dagegen bleibt in Lösung. Ist auch bei anhaltender Dialyse mit destilliertem

<sup>1)</sup> Fr. Kutscher, Zeitschr. f. physiol. Ch. 23. 117. 1897.

<sup>2)</sup> K. A. H. Mörner, Zentralbl. f. Physiol. 7. 581. 1893.

<sup>3)</sup> J. C. Lehmann, Virchows Archiv 36. 125. 1866.

<sup>4)</sup> Heynsius, Archiv f. klin. Med. 22. 435. 1878. — Führy-Snethlage, daselbst 17. 418. 1876.

Wasser zu einem Zeitpunkt, in welchem sich im Aussenwasser schon bloss Spuren von Salz nachweisen lassen, noch kein Niederschlag im Dialysator entstanden, so könnte das Globulin in Verbindung mit einem Alkali in Lösung geblieben sein und es empfiehlt sich in solchen Fällen, die Flüssigkeit aus dem Dialysator herauszugliessen und in dieselbe Kohlensäure zu leiten. — Die dialysierte Flüssigkeit, in welcher der Globulinniederschlag entstanden ist, enthält noch das Albumin gelöst; man entfernt dieses, wenn es darauf ankommt, durch Auswaschen des Niederschlages (mittels Dekantieren, wenigstens im Anfang). — Über das Verhalten des Globulins bei der Dialyse s. vorher.

c) Das gesamte im Harn enthaltene Globulin (Serumglobulin und Fibrinogen) lässt sich dagegen durch Fällen desselben mittels eines dazu geeigneten Neutralsalzes gewinnen, wozu sich nach Hammarsten vollständige Sättigung der Lösung mit Magnesiumsulfat, nach Pohl<sup>1)</sup> Sättigen derselben bis zur Hälfte mit Ammonsulfat empfiehlt oder mit  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  bei 33°.

Das Verfahren ist im Grunde dasselbe, wie das zum Nachweis des Albumins als solchem dienende (s. S. 1122). Weil dabei aus saurem Harn auch Albumin niedergeschlagen wird, so macht man ihn vorher mindestens amphoter, noch besser schwach alkalisch und filtriert einen dadurch etwa entstehenden Niederschlag vor dem Salzzusatz ab.

Nach Hammarsten wird in den Harn fein gepulverte schwefelsaure Magnesia (120 g krystallisierte auf 100 ccm) eingetragen, bis sich von dem Salze auch nach längerer Berührung mit dem Harn nichts mehr auflöst, die Flüssigkeit samt dem flockigen Niederschlag auf ein Filter gebracht, der Salzbodensatz mit gesättigter Lösung von schwefelsaurer Magnesia aufgerührt, diese Flüssigkeit ebenfalls filtriert und das Filter mit gesättigter Magnesiumsulfatlösung gewaschen; ist es erforderlich, das Globulin vollständig vom Albumin zu befreien, so muss das Waschen so lange fortgesetzt werden, bis das Filtrat nach Zusatz von Essigsäure durch Kochen nicht einmal opalin wird.

Pohl versetzt den alkalisch gemachten Harn mit seinem Volumen kalt gesättigter Ammonsulfatlösung, filtriert nach einstündigem Stehen und wäscht den Niederschlag mit halbgesättigter (mit ihrem Volumen Wasser verdünnter gesättigter) Ammonsulfatlösung nach, bis im Filtrat mit Essigsäure und Ferrocyankalium kein Eiweiss mehr nachweisbar ist.

Nach beiden Methoden werden auch Albumosen sowie die mucinähnliche Substanz ganz oder teilweise gefällt.

Will man die Niederschläge frei von Salzen haben, so müssen sie noch der Dialyse unterworfen werden.

In den meisten Fällen wird es für den Nachweis von Globulin genügen, dass ein Niederschlag entsteht. Eine Verwechslung von Magnesiumphosphat mit Globulin hat man bei dem ersten Verfahren nicht zu fürchten, weil sich der dabei anfangs entstehende Niederschlag von Magnesiumphosphat in der gesättigten Bittersalzlösung leicht löst (Huppert). Bei dem Verfahren von Pohl lässt sich eine Verwechslung mit Phosphat dadurch ausschliessen, dass man den mit Ammoniak alkalisch gemachten Harn einige Zeit stehen lässt und den dann gebildeten Niederschlag abfiltriert; harnsaures Ammon, welches gleich-

<sup>1)</sup> Hammarsten, Pflügers Archiv 17. 431 u. 447; 22. 437 und briefliche Mitteilung. Pohl, Archiv f. exper. Path. 20. 426. 1886.

falls ausfallen kann, scheidet sich im Gegensatz zum Globulin allmählich als gefärbter Niederschlag ab.

Paton <sup>1)</sup> empfiehlt zum Nachweis von Globulin den Harn schwach alkalisch zu machen und (nach dem Filtrieren) auf eine gesättigte Bittersalzlösung zu schichten; ein weisser Ring zeigt das Globulin an.

Das Globulin erkennt man daran, dass es sich, noch salzhaltig, in Wasser löst. Das durch Dialysieren salzfrei gewonnene Globulin löst sich in 5–10%iger Kochsalz- oder Bittersalzlösung, oft nicht vollständig, weil es zum Teil in die unlösliche Modifikation übergegangen ist; dagegen löst es sich immer leicht in verdünnten Alkalihydraten und verdünnten Alkalicarbonaten, sowie in verdünnten Säuren. Wenn sich ein solcher Niederschlag, wie Acidalbumin bzw. Alkalialbuminat, bloss in Säuren oder Alkalien löst, hat man darum noch keinen Grund zu der Annahme, der Harn habe Acidalbumin bzw. Albuminat enthalten.

Weitere Eiweissreaktionen lassen sich mit dem vermeintlichen Globulin nur nach völliger Entfernung des Albumins anstellen.

Von der mucinartigen Substanz des Harns unterscheiden sich die echten Globuline dadurch, dass die Lösung jener Substanz einen in überschüssiger Essigsäure sehr schwer löslichen, diese einen leicht löslichen Niederschlag geben.

Von der Heteroalbumose lässt sich das Globulin durch die Bestimmung des Koagulationspunktes und dadurch unterscheiden, dass das Globulin zu Acidalbumin wird, die Albumose dagegen nicht.

a) Zur Ermittlung des Koagulationspunktes (68–80°) löst man den noch salzhaltigen Niederschlag in wenig Wasser. Die im Harn vorkommende Albumose zeigt das Maximum der Trübung bei 59–60°, das in Salzwasser gelöste Fibrinogen bei 55°, das Serumglobulin (wie das Albumin) bei 75°.

b) Der Dialysationsniederschlag wird mit 1%iger Natriumcarbonatlösung im Wasserbad digeriert. Entsteht bei der Neutralisation der so hergestellten Lösung ein in Salzwasser unlöslicher Niederschlag, so bestand der Eiweisskörper aus Globulin; die Albumose bleibt beim Neutralisieren in Lösung oder wird vom Salzwasser wieder gelöst. — Eine Lösung der ursprünglichen Substanz in Salzwasser wird mit Salzsäure versetzt, ein entstehender Niederschlag nach einiger Zeit abfiltriert, abgepresst und in Wasser gelöst. War die fragliche Substanz Globulin, so gibt sowohl die Lösung des Salzsäureniederschlages in Wasser, als die von ihm abfiltrierte Flüssigkeit beim Neutralisieren einen in Salzwasser unlöslichen Niederschlag. — Es ist für beide Proben überflüssig, das vermeintliche Globulin vorher albuminfrei zu waschen, wenn viel desselben vorliegt.

Zur Unterscheidung des Fibrinogens und des Globulins lassen sich ihre Gerinnungstemperaturen, das Verhalten beider gegen Kochsalzlösung, gegen Ammoniumsulfatlösung und ihre Beteiligung bei der Fibrinbildung verwenden.

a) Zur Bestimmung des Koagulationspunktes dient eine Lösung des Salzniederschlages in Wasser.

b) Eine Lösung von Globulin in Kochsalzwasser kann bei Zusatz des gleichen Volumens gesättigter Kochsalzlösung selbst dann noch klar bleiben, wenn

<sup>1)</sup> N. Paton, *Edinburgh med. Journ.* **152**. Dec. 1888. 522.



sie reich an Globulin ist, während schon weit schwächere Fibrinogenlösungen dabei einen Niederschlag geben.

e) Eine Fibrinogenlösung liefert in Gegenwart eines Calciumsalzes mit Fibrinferment (Blut) Fibrin, während das Globulin bei der Fibrinbildung unbeteiligt ist; lässt sich ein spontan nicht gerinnendes Transsudat (Hydroceleflüssigkeit) durch Auflösen von Globulin aus Harn in demselben (bei 40°) zur Gerinnung bringen, wie in der Tat beobachtet wurde (Führy-Snethlage), so beweist der Versuch nicht die Gegenwart des Globulins, sondern nur die des Fibrinfermentes.

## 2. Fibrinogen.

A. Vorkommen. Fibrinogen, die Muttersubstanz des Fibrins, ist in allen Fällen anzunehmen, in welchen sich im Harn beim Stehen ein Fibringerinnsel bildet (s. bei Globulin und bei Fibrin). Der direkte Nachweis des Fibrinogen ist bisher nicht erbracht.

B. Eigenschaften. Das Fibrinogen gehört zur allgemeinen Gruppe der Globuline. Es unterscheidet sich vom gewöhnlichen Serumglobulin, abgesehen von der sog. spontanen Gerinnbarkeit, durch seine wesentlich leichtere Fällbarkeit durch Neutralsalz. Die Aussalzungsgrenzen für Ammoniumsulfat liegen nach Reye<sup>1)</sup> wesentlich tiefer wie die des Serumglobulin, und zwar je nach der Konzentration, beginnend von 1,7 bis 1,9 und endigend bei 2,5 bis 2,8.

Dementsprechend ist das Fibrinogen schon durch halbe Sättigung mit NaCl teilweise, durch Sättigen mit Kochsalz vollständig aussalzbare. Beim Aufbewahren unter Wasser, sowie beim Auswaschen auf dem Filter büsst das Fibrinogen sehr rasch das Vermögen, sich in verdünnter Salzlösung aufzulösen, ein, wesentlich rascher wie das Serumglobulin. — Wird eine Lösung von Fibrinogen in Salzlösung im Vakuum verdunstet, so ist der trockene Rückstand in Salzwasser nur zum Teil löslich.

Eine Lösung von Fibrinogen in Salzwasser gerinnt bei 52—55°, die in einer zur Lösung gerade hinreichenden Menge Alkali bei 56—58°; der aus Alkalifibrinogen erhaltene Niederschlag löst sich beim Kochen ganz oder teilweise und das Fibrinogen wird dabei zu Albuminat.

CaCl<sub>2</sub> gibt in verdünnten salzfreien Lösungen von Alkalifibrinogen kalkhaltige Niederschläge, nicht aber in salzhaltigen Lösungen oder bei Verwendung eines Überschusses von Kalksalz.

Unter dem Einfluss von Fibrinferment verwandelt sich das Fibrinogen in Fibrin.

C. Nachweis. Der Nachweis des Fibrinogens fusst auf der Isolierung durch fraktioniertes Aussalzen oder in der Erzeugung eines

<sup>1)</sup> W. Reye, Diss. Strassburg 1898.

Fibringerinnsels durch Hinzufügen einer Fibrinferment enthaltenden Lösung. Die Isolierung erfolgt zweckmässig in Anlehnung an die von Reye für das Plasma gegebenen Vorschriften, indem man die betreffende Lösung zunächst durch Zusatz des gleichen Volums kalt gesättigter NaCl-Lösung fällen, den Niederschlag in 6—8%iger Kochsalzlösung wieder löst und dann die Fällung mit konzentrierter Kochsalzlösung mehrfach wiederholt. Schliesslich wird durch Dialyse gegen 0,003%ige NaOH-Lösung von Kochsalz befreit. Aus dieser salzfreien Lösung kann das Fibrinogen durch Alkohol oder durch Einleiten von Kohlensäure ausgefällt werden.

### 3. Fibrin (s. auch bei Sedimenten).

A. Vorkommen. Das Fibrin kann im Harn, bei Blutungen in den Harnwegen, sowie bei Chylurie auftreten.

Ferner kann man eine „Fibrinurie“ im engeren Sinne unterscheiden, die ein Zeichen einer heftigen Entzündung der Harnwege, des Nierenbeckens, der Uretheren oder der Blase ist. Hier setzt der Harn gleich nach der Entleerung teils feste, teils gallertartige Gerinnsel ab, oder er führt sie schon bei der Entleerung mit sich, wenn die Gerinnung schon im Körper stattgefunden hat (Nierenbecken, Urether, Blase).

Hersch-Ber Kutner hat 13 derartige Fälle aus der Literatur zusammengestellt, beobachtet von Nasse, Senator, Baumüller, v. Jaksch, Klein, Lortorfer, Quincke, Imbert und Blaufuss, Böttzold, Trischitta, Isaak und Mosse<sup>1)</sup>.

Quincke gibt ferner an, mehrfach Fibrinurie bei Schrumpfnieren gesehen zu haben.

Fr. Müller gibt an (zitiert nach der 10. Aufl. dieses Handbuchs) in einem Fall von parenchymatöser Nephritis gegen das tödliche Ende Fibrinbildung gesehen zu haben.

Die Gerinnsel bestehen nicht immer ausschliesslich aus Fibrin, sondern können auch Mucin und Nucleoalbumin enthalten.

Der Harn hungernder Kaninchen gerinnt häufiger zu einer festen Gallerte. Worauf diese Gerinnung beruht, ist mir nicht bekannt. Angaben in der Literatur hierüber sind mir nicht aufgestossen (Schulz).

Moruzzi<sup>2)</sup> beobachtete, dass der Harn eines an Nephritis tubul. desquam. acuta leidenden Kindes bei Zusatz von Essigsäure sich in eine dichte, vollkommen durchsichtige Gelatine verwandelte. Bedingung war: hoher Eiweissgehalt und geringer Salzgehalt.

<sup>1)</sup> Hersch-Ber Kutner, Diss. Berlin 1907. — H. Nasse, Unters. f. Physiol. u. Pathol. **1**. 209. 1836. — H. Senator, Virchows Archiv **60**. 1874. — Baumüller, Ebenda **82**. 1880. — v. Jaksch, Zeitschr. f. klin. Med. **22**. 1893. — A. Klein, Wiener klin. Wochenschr. 1896. 5. 709. — R. Lortorfer, Ebenda 1903. Nr. 7. — H. Quincke, Deutsches Archiv f. klin. Med. **79**. 1904. — L. Imbert und O. Blaufuss, Annales des Maladies des Organes genitourinaires. Montpellier 1902. Nr. 2. — O. Blaufuss, Thèse de Montpellier 1902. — Bozzolo, Contributo alla diagnosi della pilita (Pyelitis) calcolosa. Torino 1877. — Trischitta, Clinica medica 1900. 525. — A. Isaak, Archiv f. Dermatol. u. Syphilis **67**. 1903. — Mosse, Berliner klin. Wochenschr. 1906. Nr. 9.

<sup>2)</sup> G. Moruzzi, Med. Klinik **33**. 1278. 1911.

B. Eigenschaften. Reines Fibrin, wie es von Hammarsten analysiert wurde, ist in der elementaren Zusammensetzung nur wenig vom Fibrinogen verschieden. Es quillt in schwachen Laugen und Säuren nur zu einer festen Gallert auf, löst sich aber in denselben in der Kälte ebenso wenig wie in Neutralsalzlösungen; die schwachen Säuren und Laugen lösen es aber bei längerer Einwirkung in der Wärme. Aus serumglobulinhaltigen Flüssigkeiten abgeschiedenes Fibrin enthält Serumglobulin eingeschlossen.

C. Nachweis. Wenn sich Gerinnsel im Harn vorfinden, so filtriert man sie durch ein dichtes Tuch vom Harn ab und knetet sie, um das anhaftende Serumglobulin zu entfernen, zunächst in oft erneuerter 5—10%iger (thymolisierter) Kochsalzlösung, bis die Lösung keine Eiweissreaktionen mehr gibt. Bleibt dabei Gerinnsel übrig, so spricht diese Tatsache schon sehr für die Gegenwart von Fibrin. Der Rückstand darf sich in der Kälte nicht in verdünnten Alkalien oder verdünnten Säuren lösen, muss aber bei längerer Digestion in der Wärme in 1%iger Sodalösung oder 0,5%iger Salzsäure in Lösung gehen und die Lösung dann Eiweissreaktionen geben. — Mit Pepsinsalzsäure tritt bei Brutttemperatur sehr rasch Lösung ein. Die Fibrinfasern zeigen die Weigertsche Fibrinfärbung.

### III. Die mit Essigsäure fällbaren Eiweissstoffe des Harns.

Allgemeines. Ausser den bisher besprochenen Eiweissstoffen, die offenbar direkt aus dem Blute stammen, treten verhältnismässig häufig kombiniert mit den erstgenannten Eiweissstoffen oder auch ohne dieselben Eiweissstoffe auf, die eine ganz andere diagnostische Bedeutung haben. Es sind besonders die Fälle von zyklischer Albuminurie (auch orthostatische, orthotische, juvenile Albuminurie oder Pubertätsalbuminurie genannt), in welchen diese Eiweissstoffe in oft beträchtlichen Mengen zur Ausscheidung gelangen.

Die Charakterisierung dieser Eiweissstoffe ist in den meisten Fällen eine so mangelhafte, dass es schwer ist, ein Bild von dem tatsächlichen Stand unseres Wissens auf diesem Gebiete zu geben. Es ist notwendig, ehe auf die Mitteilung des Tatsächlichen eingegangen wird, gewisse Richtschnuren festzulegen, nach denen die Charakterisierung solcher Eiweissstoffe mit den uns heute zur Verfügung stehenden Mitteln zu geschehen hat. Es ist ohne Frage nicht statthaft, die durch Essigsäurezusatz fällbaren Eiweissstoffe des Harns als gleichwertig oder gar identisch anzusprechen. Wenn in einer Eiweisslösung durch Essigsäure ein Niederschlag entsteht, so kann daran Schuld sein die spezifische Natur des betreffenden Eiweissstoffes. Zu den mit Essigsäure direkt fällbaren Eiweissstoffen gehört der Schleimstoff, das Mucin, sowie manche andere Proteide, z. B. Nucleoalbumine und Nucleohistone. Es ist aber auch möglich, dass ein durch Essigsäure an und für sich nicht direkt fällbarer Eiweissstoff fällbar wird durch andere Stoffe, die mit ihm in Lösung sind. Gerade diesen letzteren Punkt hat man bei der Harnuntersuchung erst sehr spät berücksichtigt. Es können die Verhältnisse



so liegen, dass im Harn Stoffe vorhanden sind, welche an und für sich fällbare Stoffe an der Fällung verhindern oder auch Stoffe, welche an und für sich nicht fällbare Stoffe ausfällen. Beides ist in praxi zu berücksichtigen.

Unter diesen Umständen ist es nicht zu verwundern, dass die Angaben ausserordentlich auseinandergehen. Will man Verschiedenartiges auseinanderhalten, so kann man das erstens tun durch Aufklärung der Fällungsverhältnisse und andererseits durch Untersuchung der entstandenen Niederschläge.

Wenn es sich um ein echtes Mucin handelt, so muss der Nachweis zu führen sein, dass bei Hydrolyse ein reduzierendes Kohlehydrat in beträchtlicherer Menge gebildet wird. Bei Vorhandensein eines Nucleoalbumin oder eines ähnlichen Eiweissstoffes (Nucleohiston), ist der Nachweis von Phosphor im Niederschlag zu verlangen. Ausserdem ist nach Möglichkeit durch fraktionierte Fällung am besten mit Ammoniumsulfat festzustellen, welche Fällungsgrenzen der betreffende Stoff hat.

So erscheint denn als gesichertes Ergebnis folgendes festgestellt: Echtes Mucin aus den Schleimhäuten der Harnwege stammend, bildet den Hauptbestandteil der Nubekula des normalen Harns; bei Reizzuständen dieser Schleimhäute kann die Menge des Mucin zunehmen. Nach Mörner bezeichnet man diesen Eiweissstoff zweckmässig als „typisches Harnmucoid“.

Neben diesem typischen Harnmucoid kann der Harn auch noch andere durch Essigsäure fällbare Eiweissstoffe enthalten. Es ist nach den Untersuchungen von K. A. H. Mörner sicher, dass der Harn Stoffe enthält, die bei essigsaurer Reaktion mit den gewöhnlichen Eiweissstoffen des Harns (Serumalbumin und Serumglobulin) Niederschläge bilden. Aber auch ohne solche von Mörner besonders charakterisierte, eiweissfällende Stoffe (vor allem Chondroitinschwefelsäure) können Serumglobulin und Fibrinogen durch Essigsäure direkt aus dem Harn gefällt werden. Aus dem Blutserum sind diese Stoffe nicht fällbar durch Essigsäure, nach Matsumoto<sup>1)</sup> ist es im wesentlichen der Salzangel, der hier das Ausfällen des Fibrinogen und des Globulin verhindert. Fügt man zu Blutserum etwas Chlornatrium oder auch normalen Harn, so erzeugt Essigsäure eine Fällung.

Ausserdem ist in seltenen Fällen mit Sicherheit ein phosphorhaltiger Eiweissstoff nachgewiesen worden. Derselbe kann aus Leucocyten des Harns stammen oder aber schon durch direkte Ausscheidung durch die Nieren in den Harn gelangt sein. Wir haben also getrennt zu betrachten: 1. Das typische Harnmucoid, 2. die durch Essigsäure

<sup>1)</sup> Matsumoto, Deutsches Archiv f. klin. Med. 75. 398. 1903.

fällbaren Eiweissstoffe, welche phosphorfrei sind, 3. phosphorhaltige, durch Essigsäure fällbare Eiweissstoffe.

### A. Das typische Harnmucoid.

Die Mucinsubstanz des Harns ist von K. A. H. Mörner<sup>1)</sup> untersucht worden.

A. Vorkommen. Das Mucoid bildet fast den einzigen eiweissartigen Bestandteil der Nubekula des Harns; aus der Nubekula von 260 Liter Harn gewann Mörner ungefähr 4,5 g. Auch in gelöster Form kommt etwas Mucoid, aber keineswegs eine erhebliche Menge im Harn vor und scheint dahin aus (den Zellen) der Nubekula gelangt zu sein. Es stammt aus der Schleimhaut der Harnwege.

### B. Eigenschaften.

Der Entdecker des Harnmucoids unterscheidet ein typisches, ohne Anwendung von Wärme dargestelltes Mucoid von dem durch Wärme etwas veränderten, „in Wasser löslichen“ Mucoid. Die nachstehende Beschreibung bezieht sich auf das typische.

Das Harnmucoid besitzt eine grosse Ähnlichkeit mit dem von C. Th. Mörner<sup>2)</sup> aus dem Eiereiweiss dargestellten Ovomucoid, ist aber mit ihm doch nicht identisch.

1. Das Harnmucoid bildet nach dem Trocknen über Schwefelsäure ein weisses oder ganz schwach gelbliches Pulver. Es enthält im Mittel 49,40% C, 12,74% N und 2,30% S, aber keinen Phosphor. Sein grosser Gehalt an Schwefel nähert es der Hornsubstanz und es kann daher, wie das Ovomucoid, als *Keratomucoid* bezeichnet werden.

Die Analyse wurde nach dem Verfahren von Frankland-Klingemann ausgeführt und deshalb der Wasserstoff nicht bestimmt.

2. Bisweilen löst es sich mit schwach saurer Reaktion in Wasser, bisweilen nicht; es quillt dann bei kurzem Erwärmen in Wasser auf, kann aber durch eine Spur Ammoniak oder Lauge, gleichfalls mit saurer Reaktion, in Lösung gebracht werden. Auch schwache Natriumacetatlösung nimmt es leicht auf. Ob die in dem Präparat in geringer Menge enthaltenen Salze von Bedeutung für die Löslichkeit sind, ist nicht entschieden; aber beim Aufbewahren büsst es an Löslichkeit ein. Die Lösung ist klar, gewöhnlich schwach gelb, leicht filtrierbar, nicht dickflüssig, noch weniger schleimig oder fadenziehend, aber ziemlich stark lichtbrechend.

3. Die spezifische Drehung wurde bei einem in Wasser löslichen Präparat zu  $[\alpha]_D = -62^\circ$  bestimmt.

Ein in Wasser nicht lösliches, in etwas Kalilauge gelöstes Präparat ergab  $[\alpha]_D = -63,7^\circ$  und ein ebensolches in Ammoniak gelöstes  $[\alpha]_D = -67,1^\circ$ .

<sup>1)</sup> K. A. H. Mörner. Skandin. Archiv 6. 338. 1895.

<sup>2)</sup> C. Th. Mörner, Zeitschr. f. physiol. Ch. 18. 525. 1893.

4. Beim Kochen trübt sich die von Haus aus schwach saure wässerige Lösung nicht, auch nicht bei Gegenwart von wenig oder viel Kochsalz.

5. Essigsäure erzeugt in der wässerigen oder mit Hilfe von wenig Ammoniak oder Lauge hergestellten Lösung einen Niederschlag, der durch einen Überschuss von Essigsäure (2,5—5,5%) wieder in Lösung geht. Das Harnmucoid löst sich also in Essigsäure viel leichter als andere Mucine. Neutralsalze (Kochsalz, Chlorammon) erschweren die Fällung durch Essigsäure; bei Gegenwart mässiger Mengen Salz bleibt die Lösung klar, wird aber etwas dickflüssig, beim Schütteln mit Chloroform scheiden sich dann nur etwas klebrige Flocken ab. Grössere Mengen Salz können diese Fällung ganz verhindern und sie tritt dann erst auf Zusatz von mehr Essigsäure ein.

6. Auch Mineralsäuren fällen das Mucoid, lösen es aber leichter als Essigsäure. Ein weiterer Überschuss an Mineralsäure ruft nicht, wie bei den echten Eiweisskörpern, wieder einen Niederschlag hervor.

Schichtet man die Mucoidlösung auf konzentrierte Salpetersäure (Hellersche Eiweissprobe), so bildet sich der weisse Ring nicht an der Berührungsstelle beider Flüssigkeiten, sondern einige Millimeter weiter oben, und dieser Niederschlag verschwindet, wenn die Salpetersäure dahin diffundiert. Eine essigsaure Lösung des Mucoids gibt diese Probe gleich gar nicht.

Ebenso verhalten sich die eiweissfällenden Säuren: Metaphosphorsäure, Trichloressigsäure, Sulfosalicylsäure, Pikrinsäure, Pikrinsäure mit Zitronensäure (Esbachs Reagens), eine geringe Menge erzeugt einen Niederschlag, der sich in einem Überschuss löst; noch grössere Mengen bewirken keine Fällung und eine mit Essigsäure versetzte Lösung gibt mit diesen Säuren schon anfangs keinen Niederschlag.

Die (eiweissfällende) Chondroitinschwefelsäure kann die Fällung des Mucoid durch Essigsäure, sowie die Abscheidung des Mucoids durch Chloroform verhindern.

Wird eine neutrale, mit etwas Ammoniak bereitete Mucoidlösung normalem sauren Harn zugesetzt, so entsteht bei keinem Mischungsverhältnis eine Trübung. Ebenso negativ fiel der Versuch aus auf Zusatz von Mucoidlösung zu Harn, der durch Dialyse vom grössten Teil der Chloride, von einem geringeren der Phosphate befreit und mit Chloroform geschüttelt war; aber nach dem Zusatz des Mucoids fiel beim Schütteln mit Chloroform ein geringer Teil des Mucoids aus.

7. Sättigen mit Kochsalz fällt das Mucoid nicht, auch nicht in der Wärme; durch Eintragen von Magnesiumsulfat, sowie auf Zusatz mehrerer Volumen von neutralem gesättigten Ammonsulfat entstehen reichliche Niederschläge.

8. Von den Metallsalzen fällen Kupfersulfat, Silbernitrat, Bleizucker, Sublimat, Eisenchlorid, Alaun das Mucoid nicht; auch in der salzsäurehaltigen Lösung gibt Sublimat, selbst in Gegenwart von etwas Kochsalz, keinen Niederschlag zum Unterschied von echtem Eiweiss. Nur Bleiessig erzeugt einen im Überschuss schwer löslichen Niederschlag.



### 9. Das Mucoid fällt in geringem Grade Eiweisslösung.

Beim Überschichten einer essigsauen Mucoidlösung mit einer Lösung von verdünntem Blutserum in Essigsäure (0,2%) kann eine Trübung entstehen.

10. Alkaloidreaktionen. Das Mucoid wird reichlich gefällt nur durch Jodjodkalium und Salzsäure, Phosphorwolframsäure und Salzsäure, Tannin mit Essigsäure und Kochsalz.

Dagegen gibt das Mucoid keinen Niederschlag mit Jodjodkalium, sowie mit Kaliumquecksilberjodid und Essigsäure unter Bedingungen, unter denen gewöhnliches Eiweiss niedergeschlagen wird. Kaliumquecksilberjodid und Salzsäure fällt die Lösung des Mucoids nur dann, wenn es bereits (durch Einwirkung von Wärme) verändert ist. Auch die eiweissfällenden Säuren (s. dort) und Sublimat (s. dort) schlagen das typische Mucoid nicht nieder, wohl aber einige von ihnen das veränderte.

Ferrocyankalium mit Essigsäure oder mit ein wenig Salzsäure gibt gleichfalls keinen Niederschlag, ebenso wenig Chondroitinschwefelsäure und wenig Essigsäure in einem Verhältnis, in welchem Eiweiss gefällt wird; bei Gegenwart von viel Essigsäure erzeugt aber Chondroitinschwefelsäure einen im Überschuss der Säure löslichen Niederschlag.

11. Farbenreaktionen. Das Mucoid gibt die Farbenreaktionen der Eiweisskörper.

Es treten ein die Biuretprobe und die Xanthoproteinprobe. Bei der Reaktion von Adamkiewicz entsteht eine rosenrote Färbung. Das Millonsche Reagens gibt einen Niederschlag, der beim Kochen rot wird, während die Flüssigkeit ungefärbt bleibt.

Mit  $\alpha$ -Naphthol und konzentrierter Schwefelsäure wird eine vorübergehende Rotfärbung erhalten; eine violette Färbung wie beim Zucker kommt nicht zustande.

12. Zersetzungen. a) Das Mucoid verändert schon bei der Behandlung mit heissem Wasser seine Eigenschaften.

Das über Schwefelsäure getrocknete verändert sich beim Erhitzen auf 110°, selbst 130° nicht wesentlich; auch das in Lösung auf 100° erhitzte, dann (mit Essigsäure und Chloroform) ausgefällte Mucoid ist nach dem Trocknen über Schwefelsäure noch in Wasser löslich, büsst aber die Löslichkeit in Wasser und in Natriumacetat durch Trocknen bei 110—115° fast ganz ein, und das durch Eindampfen seiner wässrigen Lösung gewonnene Mucoid löst sich selbst in (schwachem) Ammoniak nicht oder nur sehr langsam; durch Erhitzen mit Wasser kann dieses aber zum Teil in Lösung gebracht werden.

Wird eine wässrige oder mit etwas Ammoniak oder Kalilauge hergestellte saure Mucoidlösung im zugeschmolzenen Rohr 4—5 Stunden im Wasserbad erhitzt, so sinkt seine spezifische Drehung beträchtlich (bis auf  $-53^\circ$ ), ohne dass die Lösung ihre Reaktion und Farbe verändert noch ihre Durchsichtigkeit eingebüsst hat. Es wird dann auch nicht mehr durch Essigsäure gefällt, aber im Gegensatz zum typischen Mucoid, oft durch Jodquecksilberkalium niedergeschlagen und kann selbst mit Jodquecksilberkalium und Essigsäure, mit dem Esbachschen Reagens und mit Trichloressigsäure Niederschläge geben. Die Veränderung in der Zusammensetzung ist unbedeutend; es kann der Stickstoffgehalt des Produkts etwas höher sein, als der des typischen Mucoids (13,12% gegen 12,78). Neben diesem, durch Alkohol fällbaren Produkt entsteht ein durch Alkohol nicht fällbares, welches die Millonsche Reaktion nicht gibt und schon für sich alkalische Kupferoxydlösung ziemlich schnell und stark reduziert.

b) Wird eine Mucoidlösung mit alkalischer Kupferoxydlösung im Wasserbad erwärmt, so beginnt sie nach etwa 5 Minuten

einen geringen Niederschlag von Kupferoxydul (und Schwefelkupfer) abzuschcheiden. Diese Reduktion scheint um so leichter einzutreten, je stärker alkalisch die Kupferlösung ist.

c) Erwärmt man eine Mucoidlösung mit einigen Prozent Salzsäure auf dem Wasserbade, so färbt sie sich allmählich braunviolett und scheidet dann mit alkalischer Kupferoxydlösung viel reichlicher Kupferoxydul ab als ohne vorgängige Behandlung mit Salzsäure. Die Reduktion tritt jedoch lange nicht so schnell auf, wie mit einer Traubenzuckerlösung.

Die Chondroitinschwefelsäure und ihre Eiweissverbindungen verhalten sich ebenso, bei der Zersetzung dieser tritt aber Schwefelsäure auf. Die Reduktion tritt auch ein, wenn das Mucoid mit 0,1—0,15%iger Salzsäure 1—2 Stunden in siedendem Wasser erhitzt worden ist. Danach geben Jodquecksilberkalium, Esbachs Reagens, Metaphosphorsäure und Trichloressigsäure Niederschläge, nach längerem Erhitzen auch Ferrocyanwasserstoff und Sulfosalicylsäure. Beim Schichten der Lösung auf Salpetersäure tritt in der Grenzschicht kein Niederschlag, aber eine Gelbfärbung ein. Es entsteht also bei der Zerlegung neben dem reduzierenden Körper eine Substanz, welche Eiweissreaktionen gibt, wahrscheinlich eine Albumose. Bei unvollendeter Zersetzung wird durch Alkohol aus der Lösung eine Substanz gefällt, welche ein wenig mehr Kohlenstoff und Stickstoff enthält, als das ursprüngliche Mucoid.

d) Beim Erwärmen des Mucoids mit Salzsäure spaltet sich keine Schwefelsäure ab; es enthält also den Schwefel nicht in der Form einer gepaarten Schwefelsäure wie die Chondroitinschwefelsäure.

e) Lässt man eine Lösung des Mucoids in 1%iger Natronlauge in der Kälte stehen, so tritt gleichfalls eine Spaltung ein und aus der Lösung lässt sich als Kupferverbindung ein Körper abscheiden, der sich in warmem Wasser löst, stickstoffhaltig ist, aber die Millonsche Eiweissreaktion nicht gibt, und nach dem Erwärmen mit Salzsäure alkalische Kupferoxydlösung reduziert.

13. Die in Wasser lösliche Mucinsubstanz unterscheidet sich nur dadurch vom typischen Mucoid, dass sie durch Essigsäure nicht gefällt wird und eine etwas niedrigere spezifische Drehung,  $[\alpha]_D = -59,2^\circ$ , besitzt.

C. Darstellung. Die Darstellung lohnt sich nur bei der Verwendung grosser Harnmengen; Mörner hat 25—260 Liter auf einmal in Arbeit genommen. Der Harn soll eiweissfrei sein.

Man lässt den mit Chloroform sterilisierten Harn stehen, bis sich die Nebula abgesetzt hat, hebt den klaren Harn ab und bringt das Sediment auf ein Filter. Bis zur gemeinsamen Verarbeitung grösserer Mengen wird der schleimige Belag des Filters in Chloroformwasser oder besser in Weingeist aufbewahrt. Man bringt ihn dann in der Weise zur Lösung, dass man ihn in Wasser verteilt, die Flüssigkeit mit Ammoniak schwach alkalisch macht und während der Zeit, welche die Lösung beansprucht, alkalisch hält. In die Flüssigkeit leitet man dann, ohne vorher zu filtrieren, Kohlensäure bis zu schwach saurer Reaktion, wobei der grösste Teil der in Lösung gegangenen Harnsäure gefällt wird und auch etwa vorhandenes

Eiweiss ungelöst bleiben kann. Nach 1—2 tägigem Stehen in der Kälte wird filtriert und die Flüssigkeit bis zu etwa 0,4% mit Essigsäure versetzt; sie wird dabei dickflüssig, eine Abscheidung der Substanz aber durch die gegenwärtigen Salze verhindert. Schüttelt man darauf kräftig mit reichlichen Mengen Chloroform, so entsteht ein flockiger, etwas klebriger Niederschlag, den man am besten mittels der Zentrifuge sammelt und in der Zentrifuge mit 0,2—0,4%iger, mit Chloroform gesättigter Essigsäure wäscht. Der Niederschlag wird in reinem Wasser unter Zusatz von ganz wenig Ammoniak gelöst, wieder mit Essigsäure gefällt und dieses Verfahren wiederholt, wenn sich aus einer mit Salzsäure versetzten, in der Kälte aufbewahrten Probe binnen einigen Tagen Harnsäure absetzt. Zuletzt wird die Substanz mit Weingeist und darauf mit Äther zerrieben und gewaschen und über Schwefelsäure getrocknet. Das so erhaltene Präparat ist das typische Mucoid.

Die Mutterlauge enthält die lösliche Mucinsubstanz, deren Menge bisweilen bedeutend, selbst grösser als die des typischen Mucoids sein kann. Um diese zu gewinnen, werden die bei der Fällung mit Essigsäure und Chloroform (oder Essigsäure allein) erhaltenen Filtrate bei neutraler Reaktion im Wasserbade eingeeengt, schwach angesäuert und mit Alkohol gefällt. Die wässrige Lösung des Niederschlags wird durch Dialyse bei schwach saurer Reaktion von der Hauptmasse der Salze befreit und wieder mit Alkohol gefällt. Entsteht dabei nur eine Trübung, so fehlt es an Salz, und man fügt deshalb etwas Kochsalz zu. Der flockige Niederschlag wird in Wasser gelöst, durch Alkohol gefällt, mit Äther gewaschen und über Schwefelsäure getrocknet.

Auch aus Harn, der durch Dialyse vom grösseren Teil der Chloride befreit worden ist, kann Mucoid direkt durch Zusatz von Essigsäure (0,15%) und Schütteln mit Chloroform abgeschieden werden (K. A. H. Mörner)<sup>1)</sup>.

D. Nachweis. Der Nachweis fällt zum Teil mit der Darstellung zusammen. Charakteristisch für das Mucoid ist vor allem die Bildung einer Kupferoxyd in alkalischer Lösung reduzierenden Substanz beim Erwärmen mit verdünnter Salzsäure; vor Anstellung der Reaktion hat man dafür zu sorgen, dass etwa vorhandener Zucker durch Waschen der Substanz mit Alkohol entfernt wird. Verwechselt kann das Mucoid in dieser und anderer Hinsicht werden mit Chondroprotein<sup>1)</sup> (s. dort); allein dieses liefert bei der Zersetzung mit Salzsäure ausser der reduzierenden Substanz auch Schwefelsäure. Vom Chondroprotein unterscheidet sich das Mucoid noch dadurch, dass das Chondroprotein in schwach essigsaurer Lösung beim Kochen mit dem gleichen Volumen gesättigter Kochsalzlösung einen Niederschlag liefert, dass es ferner mit eiweissfällenden Säuren (Metaphosphorsäure, Trichloressigsäure, Sulfosalicylsäure, Esbachs Reagens) im Überschuss der Säuren unlösliche Eiweissniederschläge gibt und auch durch Ferrocyanwasserstoff gefällt wird.

Mit dem positiven Ausfall der Reduktionsprobe ist nur die Gegenwart eines Mucins erwiesen; der Mangel einer schleimigen Beschaffenheit der mit Essigsäure gefällten Substanz kennzeichnet sie als Mucoid.

<sup>1)</sup> K. A. H. Mörner, a. a. O. 360.



## B. Die mucinähnliche Substanz.

A. Vorkommen. Im Harn kommen fast immer kleine Mengen eines Eiweisskörpers vor, welcher früher gewöhnlich für Mucin, auch für Paralbumin, Globulin, vor Maixner auch für Pepton gehalten wurde, von Huppert aber wegen seiner auffallenden Ähnlichkeit mit dem Nucleoalbumin der Galle, und darauf auch von Obermayer auf Grund derselben Tatsachen als Nucleoalbumin bezeichnet worden ist. Vom gewöhnlichen Harneiweiss unterscheidet es sich u. a. dadurch, dass es durch Essigsäure gallertartig gefällt wird. K. A. H. Mörner<sup>1)</sup> hat nun nachgewiesen, dass es sich bei normalem Harn um weiter nichts als um Albumin handelt, welches in essigsaurer Lösung durch gewisse im Harn in kleiner Menge vorkommende Säuren: Chondroitinschwefelsäure, Nucleinsäure und Taurocholsäure, niedergeschlagen wird, um Chondroalbumin, Nucleoalbumin und taurocholsaures Albumin. Von diesen Säuren findet sich die Chondroitinschwefelsäure immer im Harn, und zwar in erheblich grösserer Menge als die Nucleinsäure, welche manchmal sogar zu fehlen scheint; die Taurocholsäure tritt im normalen Harn selten auf, ist dagegen im ikterischen Harn hervorragend an der Bildung solchen Eiweissniederschlags beteiligt. Mörner hat alle eiweissfällende Substanz aus normalem Harn durch Albumin abgeschieden und die Niederschläge analysiert, wobei sich ergab, dass ausser der Chondroitinschwefelsäure und der Nucleinsäure keine andere Substanz in erheblicher Weise an der Bildung der Niederschläge beteiligt sein kann.

Da drei verschiedene saure Bestandteile des Harns in die Verbindung eingehen können, so wird es verständlich, dass die mucinähnliche Substanz nicht in allen Fällen dieselben Eigenschaften besessen hat. Auch solche Verbindungen, in denen nur eine der Säuren enthalten ist, verhalten sich je nach dem Gehalt an Eiweiss etwas verschieden; eiweissarmer Harn liefert aber eine eiweissärmere Verbindung als eiweissreicher. Es ist auch nicht ausgeschlossen, dass den erhaltenen Niederschlägen der Eiweissverbindung manchmal freies Eiweiss beigemischt war.

Die Menge des im normalen Harn enthaltenen Albumins reicht nicht aus, um alle eiweissfällende Substanz niederzuschlagen. Gelangt mehr Eiweiss in den Harn, so nimmt auch die Menge der mucinähnlichen Substanz zu, und endlich kann das Eiweiss überwiegen. Wo eine Zunahme der mucinähnlichen Substanz beobachtet worden ist, hat

<sup>1)</sup> Huppert, Dieses Werk, 9. Aufl. 277. 1890. — F. Obermayer, Zentralbl. f. klin. Med. 13. 1. 1892. — K. A. H. Mörner, Skandin. Archiv 6. 332. 1895.

es sich entweder nur um eine Steigerung der physiologischen Albuminurie gehandelt oder um diese und vermehrte Ausscheidung eiweissfällender Substanz. Hierauf gerichtete Untersuchungen haben wesentlich nur wegen der Vermehrung der eiweissfällenden Substanz Wert. Es kommt auf die Art der Abscheidung an, ob das in geringer Menge im normalen Harn enthaltene Eiweiss als mucinähnliche Substanz oder in anderer Art nachgewiesen wird.

Aus dem Liter normalem Morgenharn von 10 gesunden Männern fällt Mörner<sup>1)</sup> direkt im Mittel 41 mg (25—89 mg) mucinähnliche Substanz; aus dem Filtrat wurden durch Zusatz von Serumalbumin im Mittel noch 54 mg (32—73 mg) gewonnen. Die gesamte im Liter Harn enthaltene Menge eiweissfällender Substanz betrug in ihrer Verbindung mit Albumin 95 (58—155) mg. Von den untersuchten Harnen erwies sich nur einer bei der Anstellung der Hellerschen Probe als schwach eiweisshaltig und gerade dieser lieferte direkt nur 26 mg der Eiweissverbindung, enthielt aber auch am wenigsten eiweissfällende Substanz.

Nur ausnahmsweise gibt nach Mörner ein Harn die S. 1166 u 1176 beschriebene Reaktion mit Salpetersäure nicht. In vermehrter Menge fand sich dieses Eiweiss im Harn Neugeborener (Flensburg), bei Kindern und Erwachsenen häufig nach angestrengter Muskeltätigkeit, unter pathologischen Verhältnissen bei Blasenkatarrh, bei hochgradiger Leukämie (Fr. Müller, Obermayer), bei Nephritis, sowie bei den verschiedensten akuten Krankheiten (Reissner u. a.), nach Obermayer namentlich solchen, welche mit einer Schädigung der Niere einhergehen (Scharlach, Diphtherie) oder dergleichen Giften (Pyrogallol, Teer, Naphthol, Sublimat, Arsen). Nach Fr. Müller kommt die mucinähnliche Substanz sehr regelmässig bei Abdominaltyphus vor, so lang hohes Fieber besteht, fehlt unter denselben Umständen bei kruppöser Pneumonie fast nie und verschwindet hier wieder am ersten oder zweiten Tage nach der Entfieberung. Enthält nach Reissner der Harn zugleich Eiweiss, so tritt es später auf und verliert sich ein paar Tage früher, als die mucinähnliche Substanz. Nach mechanischen Zirkulationsstörungen, wie sie durch Kompression des Thorax (Schreiber, Pichler und Vogt) und namentlich der Nierengefässe (Pichler und Vogt) hervorgebracht werden, findet sich reichlich mucinähnliche Substanz, oft von gewöhnlichem Eiweiss begleitet, im Harn. Die Chloroformnarkose hat nach Friedländer<sup>2)</sup> häufig das Auftreten beträchtlicher Mengen dieser Substanz im Gefolge. — Regelmässig tritt sie in grösserer Menge bei Ikterus auf und verschwindet wieder mit diesem (Obermayer); hier besteht der durch Essigsäure hervorgerufene Niederschlag zweifellos zum Teil aus taurocholsaurem Eiweiss. Vor allem erscheint der durch Essigsäure in der Kälte fällbare Eiweisskörper als integrierender Bestandteil bei der „physiologischen Albuminurie“ (orthotische, orthostatische, zyklische, juvenile Albuminurie).

Im normalen Pferdeharn kommt eine der mucinähnlichen Substanz verwandte, von Eber untersuchte Verbindung vor. Nach Eber und Smith

<sup>1)</sup> Mörner, a. a. O. 418.

<sup>2)</sup> Mörner, a. a. O. 402. — Flensburg, Skandin. Archiv 4. 146. 1893. — Fr. Müller, Mittel. a. d. med. Klinik zu Würzburg 1. 259. 1885. — F. Reissner, Virchows Archiv 24. 191. 1862. — J. Schreiber, Archiv f. exper. Pathol. 19. 255. 1885; 20. 86. 1886. — K. Pichler und V. Vogt, Zentralbl. f. i. Med. 15. Nr. 17. 1894. — F. v. Friedländer, Vierteljahrsschr. f. gerichtl. Med. [3] 8. Suppl. 49. 1895.

beruht auf ihr die eigentümlich fadenziehende Beschaffenheit des Pferdeharns. Pflug und Sidangrotzky-Hofmeister machen Angaben über das Vorkommen einer mucinähnlichen Substanz im Harn von Rindern und Kühen, Ellenberger und Tereg<sup>1)</sup> über dasselbe bei Tieren überhaupt.

Während durch diese Untersuchungen Mörners die Verhältnisse für den normalen Harn aufgeklärt sein dürften, bestehen für das Verständnis derjenigen Zustände, in welchen erhebliche Mengen eines durch Essigsäure in der Kälte fällbaren Eiweisskörpers im Harn erscheinen, noch vielerlei Schwierigkeiten. Dieses mit Essigsäure fällbare Eiweiss wurde von Fr. Müller und v. Noorden anfangs als Mucin gedeutet. Obermeyer fand dann Phosphor im Essigsäureniederschlag. Dadurch glaubte man sich berechtigt, von einem „Nucleoalbumin des Harnes“ zu sprechen. Mörner nimmt aber auch hier an, dass zum mindesten ein grosser Teil der Essigsäurefällung durch die eiweissfällenden Substanzen (Chondroitinschwefelsäure, Nucleinsäure, Taurocholsäure) niedergeschlagenes, gewöhnliches Eiweiss sei. Demgegenüber glauben Matsumoto, Rostoski, Calvo, Oswald<sup>2)</sup> den Nachweis geführt zu haben, dass es sich im wesentlichen um ein Gemenge von Euglobulin und Fibrinogen handle. Bei fraktionierten Aussalzen des Harnes, bei „physiologischer Albuminurie“ ergab sich, dass eine diesen beiden Eiweisskörpern entsprechende Fraktion vorhanden war, die auch in isoliertem Zustande die Fällbarkeit durch Essigsäure bewährt hatte.

Auch Stähelin und Joachim hatten die Globulinnatur der durch Essigsäure fällbaren Eiweisskörper behauptet. Oswald hebt hervor, dass oft grosse Mengen dieses durch Essigsäure fällbaren Eiweiss ausgeschieden werden, und glaubt, dass die Menge der „eiweissfällenden Stoffe“ zu gering sei, um diese Fällungen zu bewirken. Mörner<sup>3)</sup> leugnet die Beweiskraft der Aussalzungsversuche, da im Harn die Aussalzungsverhältnisse andere seien, wie in anderen Medien (z. B. Blutplasma).

Auf jeden Fall haben aber diese neueren Untersuchungen gezeigt, dass der Phosphor in diesen Essigsäureniederschlägen entweder ganz fehlt oder meist doch in sehr geringen Mengen vorhanden ist. Es handelt sich also bei der Untersuchung von Harnen, die mit Essigsäure eine stärkere Fällung geben, darum, festzustellen: 1. inwieweit ist eine Fällung von gewöhnlichen Eiweissstoffen durch die eiweissfällenden Substanzen des Harns vorhanden; 2. lässt sich der Nachweis führen, dass Euglobulin und Fibrinogen direkt beteiligt sind; 3. sind etwa phosphorreiche Eiweissstoffe beteiligt, die sich als Nucleoalbumine oder Nucleohistone charakterisieren lassen.

In betreff des Nachweises von Globulin und Fibrinogen s. vorher.

<sup>1)</sup> W. Eber, Zentralbl. f. d. med. Wissensch. 1886. 564. — Ferd. Smith, Proc. Roy. Soc. 46. 328. 1896. — Pflug, Die Krankheiten des uropostischen Systems unserer Haustiere 1876. — Sidangrotzky-Hofmeister, Die mikroskopische und chemische Diagnostik der Krankheiten der Haustiere 1884. — Ellenberger, Referat über die Ebersche Arbeit im Jahresber. üb. d. Leistungen d. Veterin.-Med. 1886. — Tereg, Artikel Harn in Ellenbergers Physiologie der Haussäugetiere.

<sup>2)</sup> Fr. Müller, Mitteil. a. d. Würzburger med. Klinik 1. 259. 1885. — v. Noorden, Habilitationsschrift. Giessen 1895. Deutsches Archiv f. klin. Med. 38. 205. 1896. — F. Obermeyer, Zentralbl. f. i. Med. 13. 1. 1892. — Matsumoto, Deutsches Archiv f. klin. Med. 75. 398. 1903. — Rostoski, Sitzungsber. d. physik. med. Gesellsch. 1902. 58. — A. Oswald, Hofmeisters Beiträge 5. 234. 1904. — A. Calvo, Zeitschr. f. klin. Med. 51. 502. 1903.

<sup>3)</sup> Stähelin, Münchner med. Wochenschr. 1902. Nr. 34. — Joachim, Pflügers Archiv 93. 595. 1903. — K. A. H. Mörner, Hofmeisters Beiträge 5. 524. 1904.



C. Die durch Essigsäure fällbaren Eiweissverbindungen (mit Chondroitinschwefelsäure etc.) im Sinne Mörners.

A. Eigenschaften. Mörner<sup>1)</sup> hat zu seiner Untersuchung Präparate verwendet, welche aus Harn dargestellt worden waren, der die Hellersche Eiweissprobe nicht in typischer Weise gab, die also in gewöhnlichem Sinne als eiweissfrei zu betrachten waren. Die Substanz war stets gefärbt, bisweilen ziemlich stark.

Die Eigenschaften des Nucleohiston sind unter D. gesondert beschrieben.

1. Nach den von Mörner angestellten Analysen erwiesen sich seine Präparate wesentlich als chondroitinschwefelsaures Albumin mit einer geringen Beimengung von Nucleoalbumin. Globulin war nach dem Schwefelgehalt in der Verbindung entweder gar nicht oder nur in unwesentlicher Menge enthalten.

Es wurde gefunden 48,95, 50,94 und 51,62% C, 13,30, 13,70 und 13,91% N, 2,43% Gesamtschwefel, 0,65 und 0,61% S in der Schwefelsäure und 0,08 und 0,1% P. Die Zusammensetzung der aus Eiweiss-harn erhaltenen Präparate und die eines Serumalbuminniederschlags, mit welcher die der Niederschläge aus normalem Harn nahe übereinstimmt, ist bei der Chondroitinschwefelsäure (s. dort), die der von Mme. Eliacheff analysierten bei den Ptomainen (s. dort) erwähnt.

In mucinähnlicher Substanz ist der Phosphor auch von Obermayer (in solcher aus ikterischem Harn) und von Fr. Müller nachgewiesen worden. Salkowski<sup>2)</sup> hat in einem schleimigen, nach der Reinigung so gut wie aschefreien Niederschlag, welcher sich von selbst aus einem Harn abgeschieden hatte, den Phosphorgehalt zu 1,79% bestimmt, was sehr gut für Nucleoalbumin stimmt.

2. Die von Mörner dargestellten Substanzen geben in feuchtem Zustand mit Wasser in Gegenwart von etwas fixem Alkali oder Ammoniak schon bei neutraler Reaktion leicht eine klare, gewöhnlich ziemlich stark braune Lösung. War die Substanz auf dem Wasserbad mit etwas Essigsäure eingetrocknet oder in trockenem Zustand auf 110—115° erhitzt worden, so quoll sie in verdünntem Ammoniak (0,02%) zwar auf, löste sich jedoch nicht immer vollständig; durch Erwärmen konnte sie aber in Lösung gebracht werden.

Die von Mme. Eliacheff gewonnene Substanz war sehr hygroskopisch und löste sich sehr leicht in Wasser, wenig in Alkohol und in Äther; sie besass saure Reaktion.

Die Substanz lässt sich aus dem Harn auch durch Alkohol (2 Volumen, Hofmeister<sup>3)</sup>) fällen; der Niederschlag ist grobflockig gallertig, unter dem Mikroskop höchst feinkörnig, fast homogen und löst sich in Wasser wieder mehr oder minder vollständig (Reissner, Hofmeister, Müller), was davon abzuhängen scheint, wie lang der Niederschlag im Alkohol verweilt hat.

<sup>1)</sup> Mörner l. c. 402.

<sup>2)</sup> Fr. Müller, Briefliche Mitteilung an Huppert vom 31. Januar 1895. — Salkowski, Virchows Archiv 131. 320. 1893.

<sup>3)</sup> Fr. Hofmeister, Zeitschr. f. physiol. Ch. 4. 261. 1880.

3. Die schwach ammoniakalische Lösung kann nach Mö r n e r mit Essigsäure bis zu stark saurerer Reaktion versetzt werden, ehe eine Opalescenz eintritt, bei weiterem Zusatz der Säure wird sie opalescent und schliesslich gefällt. Neutralsalz kann die Fällung beeinträchtigen. Der abgeschiedene Niederschlag löst sich in Essigsäure sehr schwer, wird aber sogleich Säure im Überschuss zugesetzt, so kann die Substanz zuweilen schon mit 1% Essigsäure gelöst werden, ein anderes Mal waren 8% Essigsäure erforderlich. Für diese Löslichkeit ist die Verdünnung der Lösung von grosser Bedeutung. — Durch einen Zusatz von mehreren Vol. Eisessig wird die Lösung nicht gefällt. In einem Überschuss von Salzsäure ist die Substanz leicht löslich.

Mit diesen Tatsachen stimmen die älteren Erfahrungen überein. Nach Hofmeister gibt Essigsäure mit der wässrigen Lösung des Alkoholniederschlags einen Niederschlag; an mucinähnlicher Substanz reicher Harn verhält sich ebenso (Reissner). Der Niederschlag löst sich nach Fr. Müller nur wenig in verdünnter überschüssiger Essigsäure, nach Reissner sowie nach Posner dagegen gut in Eisessig und nach Posner auch in konzentrierter Ameisensäure. Er löst sich gleichfalls leicht in Mineralsäuren (Reissner, Hofmeister, Müller) und deshalb geben diese nur dann einen Niederschlag, wenn sie in sehr geringer Menge angewandt werden. Kohlensäure gibt nach Müller nur eine sehr schwache Trübung und im Filtrat erzeugt Essigsäure noch einen Niederschlag. Neutralsalze beeinträchtigen die Fällung durch Essigsäure, der Niederschlag ist unvollständig.

Wie die Essigsäure gibt nach Reissner auch die Weinsäure mit Harnen, die reich an der Substanz sind, einen im Überschuss unlöslichen Niederschlag; Schwefelsäure, Salpetersäure (bei Abwesenheit von Eiweiss), Salzsäure, Phosphorsäure, Oxalsäure trüben solchen Harn nur, wenn sie sehr verdünnt oder in geringer Menge zugesetzt werden, ein Überschuss dieser Säuren bringt die Trübung sofort wieder zum Verschwinden. Zitronensäure trübt und klärt den Harn gleichfalls wieder, doch darf sie zur Erzielung einer Trübung in etwas grösserer Menge zugesetzt werden, als die genannten Säuren. Auch die durch Essigsäure oder Weinsäure erzeugte Trübung löst sich bald nach ihrer Entstehung in den genannten Mineralsäuren und in Oxalsäure wieder auf. — Die schleimige Substanz des Pferdeharns verhält sich nach Eber auch im wässrigen Auszug des Alkoholniederschlags gegen Säuren, wie die mucinähnliche Substanz des Menschenharns; nur löst auch die Zitronensäure hier im Überschuss den Niederschlag nicht wieder. — In betreff der Mineralsäuren (Salpetersäure, Salzsäure, Phosphorsäure) gelangte Müller zu dem gleichen Resultate wie Reissner.

Nach Posner<sup>1)</sup> gibt der koagulierte Anteil des Alkoholniederschlags nach dem Lösen in Essigsäure die Hellersche Eiweissprobe, viel von der Substanz enthaltender Harn gibt nach Reissner die Hellersche Probe.

Neutralsalze (Kochsalz, Salmiak, Salpeter, schwefelsaures und essigsaures Natron), sowie einfach- und zweifachsaures Natronphosphat hindern nach Reissner schon bei geringer Menge die Ausfällung der Substanz durch die Säuren, Harnstoff dagegen selbst in sehr grosser Menge nicht. Essigsaures Natron bringt eine bereits vorhandene Trübung leicht und vollständig wieder zum Verschwinden, während die anderen Neutralsalze den Niederschlag nicht ganz vollständig wieder lösen. Auch den Schleimstoff des Pferdeharns löst das Natriumacetat nach Eber leicht, während ihn Magnesiumsulfat und Natriumsulfat unverändert lassen.

Wegen der lösenden Wirkung der Salze, namentlich des Acetats, ist die durch Essigsäure bewirkte Trübung nach Reissner in nativem Harn nicht so

<sup>1)</sup> C. Posner, Virchows Archiv 104. 502. 1886.

stark, als in stark verdünntem; fügt man einem Harn, der sich mit Essigsäure trübt, anderem, deres nicht tut, hinzu, so kann in der Mischung die Trübung durch Essigsäure ausbleiben. Auch setzt sich der Niederschlag aus nativem Harn meist nicht in filtrierbarem Zustand ab, wohl aber aus verdünntem.

Der mit Essigsäure aus Harn gefällte Körper löst sich in Kalilauge und wird aus dieser Lösung durch Essigsäure wieder gefällt (Schreiber).

4. Die neutrale oder mit Essigsäure schwach angesäuerte Lösung bleibt nach Mörner beim Kochen gewöhnlich entweder unverändert oder wird nur schwach getrübt. Ebenso verhält sich eine mit etwa dem gleichen Volumen gesättigter Kochsalzlösung versetzte Lösung. Selbst nach dem Zusatz von Essigsäure bis zur schwachen Opalescenz wird die Lösung nur getrübt. Auch die Koagulation von zugesetztem Blutserum wird erschwert. Zuweilen tritt aber beim Aufkochen der schwach angesäuerten Lösung ein flockiger Niederschlag ein. Diese Verschiedenheit im Verhalten beim Kochen der Lösung ist ausser durch verschiedene Konzentration derselben bedingt durch eine Verschiedenheit im Verhältnis zwischen der eiweissfällenden Substanz und dem Eiweiss in der Verbindung. Bei unreiner, direkt aus Harn erhaltener Substanz kann sich an der Koagulation auch beigemengtes Eiweiss beteiligen.

Nach Hofmeister gibt eine wässrige Lösung des Alkoholniederschlages beim Kochen eine starke Trübung, welche auf Essigsäurezusatz flockig wird. Die Trübung tritt bei 74—76° ein und wird in der Siedehitze (ohne Essigsäure) nicht stärker (Müller).

Nach Müller wird die Substanz beim Kochen auf Essigsäurezusatz sofort gefällt. Der Niederschlag löst sich nicht in Wasser, auch nicht in Essigsäure, wenn sie nicht in sehr grossem Überschuss angewandt wird, dagegen leicht in kohlen-sauren und kaustischen Alkalien. Diese Lösung gibt beim Neutralisieren mit Essigsäure einen Niederschlag, der, wie Protein, vom geringsten Überschuss an Essigsäure wieder gelöst wird. Kocht man eine Lösung der Substanz für sich, so gibt das Filtrat nach Müller mit Essigsäure noch einen beträchtlichen Niederschlag. — Die durch Essigsäure aus heissem Harn gefällten Flocken lösen sich nach Reissner leicht in Salzsäure.

Kochen verändert an mucinähnlicher Substanz reichen Harn nach Reissner nicht, fügt man aber dem noch heissen Harn Essigsäure hinzu, so bilden sich nach wenig Augenblicken Flocken. Der in der Kälte durch Essigsäure getrübt Harn bleibt dagegen beim Kochen unverändert. Setzt man einem gekochten Harn nach dem Erkalten Essigsäure zu, so trübt er sich bloss. Enthält der Harn zugleich Eiweiss und filtriert man den beim Kochen entstandenen Niederschlag ab, so erhält man im Filtrat mit Essigsäure manchmal eine Trübung, welche noch ebenso stark sein kann, wie im ungekochten Harn (Müller), oft eine viel geringere und manchmal selbst gar keine (Reissner).

5. Sämtliche Harne, welche durch Essigsäure gefällt werden konnten, gaben nach Müller, wenn sie bei 30° mit Magnesiumsulfat gesättigt wurden, auch nach dem „Neutralisieren“ mit einfach saurem Phosphat, flockige Niederschläge. Dieselben lösten sich nach dem Waschen mit konzentrierter Magnesiumsulfatlösung leicht und fast vollständig in Wasser, die gelbliche Lösung gab mit Essigsäure einen flockigen Niederschlag, der in Essigsäure kaum, dagegen in kohlen-saurem Natron leicht löslich war, und trübte sich beim Kochen. Wiederholtes Fällen des Körpers mit Magnesiumsulfat ändert seine Eigenschaften nicht. Bei der Dialyse löst sich der Bittersalzniederschlag zuerst, dann tritt Trübung ein



und im Filtrat gibt Essigsäure kaum noch eine weitere Trübung, so dass es scheint, als ob die Substanz durch Entziehung des lösenden Neutralsalzes ausgefallen sei.

Nach dem Sättigen der Harn mit Magnesiumsulfat erhielt Müller im Filtrat durch Essigsäure keine Trübung mehr, dagegen erzeugte Sättigen der mit Essigsäure ausgefallenen Lösung der Substanz mit Bittersalz noch reichliche Trübung. Sättigen mit Kochsalz fällt die Substanz unvollständig, im Filtrat bewirkt Essigsäure noch einen Niederschlag. — v. Noorden<sup>1)</sup> sah in gekochtem Harn durch Essigsäure noch Trübung auftreten, während Sättigen mit Magnesiumsulfat keine hervorrief.

6. Bei Anstellung der Hellerschen Eiweissprobe mit einer 0,05%igen Lösung entsteht nach Mörner sogleich ein scharf begrenzter Ring dicht bei der Salpetersäure, etwa 1 cm darüber tritt ein anderer, weniger scharf begrenzter Ring auf. In einer mit Essigsäure versetzten Lösung erscheint nur der erstere Ring (s. S. 1166).

7. Die mucinähnliche Substanz gibt die sog. Alkaloidreaktionen der Eiweisskörper. Eine Lösung der reinen Substanz wird nach Mörner gefällt durch Metaphosphorsäure, Sulfosalicylsäure, Trichloressigsäure, Esbachs Reagens. Tannin gibt für sich oder in Gegenwart von Kochsalz einen reichlichen Niederschlag. Die mit einem Überschuss von Essigsäure versetzte Lösung wird, ausser durch diese Säuren, niedergeschlagen durch Pikrinsäure, Jodjodkalium, Jodquecksilberkalium, geringe Mengen Ferrocyankalium und durch Chondroitinschwefelsäure. Eine Lösung in einem geringen Überschuss von Salzsäure gibt mit wenig Ferrocyankalium, sowie mit Jodquecksilberkalium einen reichlichen Niederschlag, mit Sublimat und Kochsalz eine Trübung oder einen Niederschlag.

Hiermit stimmt das Verhalten der rohen, aus Harn erhaltenen Substanz überein. Ferrocyankalium fällt nach Reissner die essigsaure, nach Müller die salzsaure Lösung der Substanz, nach Posner auch die essigsaure Lösung des unter Alkohol unlöslich gewordenen Anteils. Auch der beim Fällen einer Lösung der Substanz mit Essigsäure in Lösung bleibende Rest wird durch Ferrocyankalium niedergeschlagen (Müller). Der Körper wird nach Hofmeister, Müller u. a. ferner gefällt durch Tannin, durch Phosphorwolframsäure, der unter Alkohol unlöslich gewordene Anteil in essigsaurer Lösung nach Posner auch fast konstant durch Metaphosphorsäure, manchmal durch Pikrinsäure, häufig durch Jodquecksilberkalium, stets durch Quecksilberchlorid. — Im Harn gibt Ferrocyankalium nach Zusatz von Essigsäure oder Salzsäure keinen Niederschlag (Reissner). Nach Stewart geben normale Harn häufig mit Pikrinsäure, Trichloressigsäure, dem Sebeliensen, Tanretschen und Millardschen Reagens (Schichtprobe) Niederschläge. Nach Martin<sup>2)</sup> wird Nucleoalbumin durch Trichloressigsäure gefällt wie echte Eiweisskörper. — Die von Mme. Eliacheff dargestellte Substanz wird durch Tannin flockig gefällt.

8. Die reine Substanz gibt die Farbenreaktionen des Eiweisses, nach Mörner die Probe von Millon, von Adamkiewicz

<sup>1)</sup> v. Noorden, Berliner klin. Wochenschr. 15. 1886. 238.

<sup>2)</sup> D. D. Stewart, Med. News 1894. 29; Jahresber. f. Tierch. 1894. 306. — C. J. Martin, Journ. of Physiol. 15. 377.

und die Biuretprobe, die Biuretprobe aber wegen der Eigenfärbung der Lösung oft undeutlich.

Mit der rohen Substanz wurden beobachtet die Biuretreaktion (Hofmeister, Müller, Eber, Posner), die Xanthoproteinreaktion (Eber), die Millonsche Reaktion (Eber), die Proben von Adamkiewicz (Posner), Liebermann (Reissner, Posner), Axenfeld (Posner)<sup>1)</sup>. Müller erhielt mit dem mucinähnlichen Körper „alle Eiweissreaktionen mit Einschluss der Biuretreaktion“.

9. Von Fällungen durch Metallsalze ist ausser den den Alkaloidreaktionen angehörigen nur die durch Bleizucker bekannt (Hofmeister, Müller).

10. Bei längerem Erwärmen mit (ungefähr 5%) Salzsäure im Wasserbad, aber keineswegs schon beim Aufkochen, spaltet sich von der reinen Substanz nach Mörner Schwefelsäure ab und entsteht zu gleicher Zeit eine Kupferoxyd in alkalischer Lösung reduzierende Substanz.

Die Bildung des reduzierenden Körpers beim Kochen der rohen Verbindung mit verdünnter Mineralsäure (2%iger Schwefelsäure) ist von Müller und Schreiber nicht wahrgenommen worden. Wenn diese Reaktion bei genügend langem Erhitzen ausgeblieben wäre, so könnte der negative Befund darin seinen Grund haben, dass die verwendete Substanz keine Verbindung der Chondroitinschwefelsäure gewesen wäre. Das von Salkowski untersuchte Nucleoalbumin aus Harn gab die reduzierende Substanz bestimmt nicht. — Die von Mme. Eliacheff untersuchte Substanz reduzierte Goldchlorid, Platinchlorid, Sublimat, sowie Silbernitrat in der Kälte, aber nicht Eisenchlorid; die mit Eisenchlorid versetzte Lösung gab mit Ferrieyankalium keinen blauen Niederschlag.

B. Nachweis. 1. Trübt sich ein Harn auf Zusatz überschüssiger Essigsäure, namentlich nach dem Verdünnen, so darf die mucinähnliche Substanz als gegenwärtig angenommen werden.

Die Verdünnung des Harns vor dem Zusatz der Essigsäure verhütet nicht nur eine Verwechslung mit einem Uratniederschlag, sondern beschränkt auch die lösende Wirkung der Harnsalze auf den Eiweisskörper.

2. Schüttelt man (normalen) mit Essigsäure stark angesäuerten Harn mit Äther oder Chloroform oder Äthylalkohol, so bildet sich nach Plóss<sup>2)</sup> an der Grenzschicht beider Flüssigkeiten ein Häutchen oder ein sulziger Niederschlag von der mucinähnlichen Substanz.

3. Die Hellersche Eiweissprobe zeigt die mucinähnliche Substanz gleichfalls an. Entsteht nach dem Schichten von Harn auf konzentrierte Salpetersäure an der Berührungsstelle ein weisser Saum, so nimmt man die Gegenwart von gewöhnlichem Eiweiss an. Die mucinähnliche Substanz wird dagegen nach Mörner<sup>3)</sup> angezeigt durch eine schwache, ringförmige oder diffuse Trübung, welche 0,5—1 cm oberhalb der Salpetersäure liegt; sie kann sich auch gegen die Salpetersäure herab erstrecken. Eine ähnliche Trübung kann in harnsäurereichen Harnen durch Ausscheidung dieser Säure entstehen; die Harnsäureaus-

<sup>1)</sup> Posner, Zentralbl. f. d. med. Wissensch. 1887. 420.

<sup>2)</sup> P Plóss, Orvosi hetilap 1890. 504; Jahrb. f. Tierch. 1890. 215.

<sup>3)</sup> Mörner, a. a. O. 402.

scheidung bleibt aber nach dem Verdünnen des Harns mit 2—3 Vol. Wasser aus, während die Trübung, welche von der mucinähnlichen Substanz herrührt, im verdünnten Harn bisweilen deutlicher ist als im unverdünnten. Die Trübung tritt auch in eiweisshaltigem Harn (neben dem Eiweissring) auf.

Es kann aber auch, wie Mörner <sup>1)</sup> beobachtet hat, in einem Harn, der arm an mucinähnlicher Substanz ist und eiweissfällende Substanz im Überschuss enthält, eine typische Hellersche Reaktion eintreten, wenn auch nur schwach. Nicht selten kann man nach Mörner oberhalb der Salpetersäure eine schwache diffuse Trübung und in dieser bisweilen eine Ausscheidung von Harnsäure wahrnehmen. — Statt der Salpetersäure kann man sich für diese Reaktion ebensogut jeder anderen Säure bedienen, es handelt sich dabei um eine Neutralisationsreaktion.

4. Nach Hammarsten <sup>2)</sup> kann man zur Trennung bezw. zum Nachweis der verschiedenen hier in Betracht kommenden Substanzen folgendermassen vorgehen:

Man unterwirft zunächst grössere Mengen Harn unter Zusatz von Chloroform der Dialyse. Darauf setzt man Essigsäure bis etwa 0,2% hinzu und lässt stehen. Der durch Abgiessen gewonnene Niederschlag wird in möglichst wenig Alkali gelöst und nochmals mit Säure gefällt. Nunmehr wird die Substanz mit 5% Salzsäure längere Zeit auf dem Wasserbad gekocht und dann die Flüssigkeit mit Baryt auf etwa freigewordene Schwefelsäure sowie auf ihr Reduktionsvermögen geprüft. Ist Reduktionsvermögen vorhanden und fehlt die freigewordene Schwefelsäure, so kann man auf Mucin schliessen, ist Schwefelsäure und Reduktion vorhanden, so ist das Mörnersche Chondroproteid vorhanden. Gelingt der Nachweis von Phosphor in deutlichen Mengen, so kann die Mörnersche Nucleinsäure-Eiweissverbindung oder echte Nucleoproteide im Niederschlag vorhanden gewesen sein. Die Unterscheidung dieser phosphorhaltigen Eiweisstoffe siehe später.

5. Lecorché und Talamon <sup>3)</sup> schichten den Harn auf eine sirupdicke Lösung von Zitronensäure; eine Trübung an der Grenzschicht zeigt die mucinähnliche Substanz an.

6. Ott <sup>4)</sup> versetzt eiweissfreien Harn zum Nachweis der mucinähnlichen Substanz mit dem gleichen Volumen gesättigter Kochsalzlösung und darauf mit Almenscher (essigsäurehaltiger) Tanninlösung.

7. Für eine nähere Untersuchung der Substanz ist eine Abscheidung derselben notwendig; man befolgt dabei die für die Darstellung des Chondroalbumins gegebene Vorschrift. Über die Art, wie die einzelnen eiweissfällenden Säuren in den Niederschlägen aufzusuchen sind,

<sup>1)</sup> Mörner a. a. O. 418.

<sup>2)</sup> O. Hammarsten, *Lehrb. d. physiol. Ch.* 6. Aufl. 1907.

<sup>3)</sup> E. Lecorché und Ch. Talamon, *Traité de l'Albuminurie*. Paris 1888. 82.

<sup>4)</sup> A. Ott, *Prager Zeitschr. f. Heilk.* 16. 177. 1895.



ist bei der Chondroitinschwefelsäure, der Gallensäure und der Nucleinsäure berichtet.

#### D. Phosphorproteide des Harns.

A. Vorkommen. Wenn auch durch die Untersuchungen Mörnerns gezeigt ist, dass die früheren häufigeren Angaben über Vorkommen von Nucleoproteiden (Nucleoalbumin, Nucleohiston) zum grossen Teil auf Täuschung beruhten, so ist doch nicht daran zu zweifeln, dass gelegentlich echte Nucleoproteide im Harn auftreten.

So sind Fälle von echter Nucleoalbuminurie bei Chlorose (v. Noorden), perniciöser Anämie (R. Schmidt), myelogener Leukämie (F. Müller, v. Noorden, Taylor), sowie bei lymphatischer Leukämie (Taylor, v. Steijskal und Erben) beschrieben worden. Salkowski<sup>1)</sup> beschreibt bei Chylurie einen Eiweisskörper, der „sich vollständig wie Casein verhielt.“

Nucleohiston, welches einen grossen Prozentsatz der Trockensubstanz der Leucocyten ausmacht, ist von Jolles<sup>2)</sup> in einem Fall von Pseudoleukämie gefunden worden.

Kolisch und Burian<sup>3)</sup> fanden bei Lymphämie zwar Histon, vermissten aber Nucleohiston. Taylor hat sowohl Histon als auch Nucleohiston in zwei Fällen von Leukämie und in einem Fall von perniciöser Anämie vergebens gesucht.

Mme. Eliacheff hat nach vollständiger Dialyse des Harns undialysierbare N, P und S enthaltende Substanzen erhalten, welche vielleicht als Verbindungen dieser Art anzusehen sind. Obermayer<sup>4)</sup> wies zuerst P im Essigsäureniederschlag des Harns nach.

Es liegt nahe daran, zu denken, dass solche Nucleoproteide abstammen von Nucleoproteiden des Nierengewebes oder von zerfallenden Leucocyten. Die Beobachtungen von Matsumoto zeigen aber, dass es Fälle von Nephritis gibt mit reichlicher Abscheidung epithelialer Cylinder, in welchen kein Nucleoprotein im Harn nachgewiesen ist, und umgekehrt kann man letzteres beobachten, ohne dass Cylinder vorhanden sind. Auch bei längerem Stehen treten aus Epithelialcylindern und Leucocyten, selbst wenn der Harn durch Soda alkalisch gemacht wurde, keine Nucleoproteide in erheblichen Mengen in den Harn über.

Andererseits ist aber an der Tatsache, dass sowohl das Nierengewebe als auch die Leucocyten Nucleoproteide liefern können, nicht zu zweifeln, nur dass es sich hier nicht um einen einfachen Auslaugungsvorgang handeln kann.

Matsumoto extrahierte mit schwach alkalischer Sodalösung aus Schweinnieren ein Nucleoprotein, das ausserordentlich leicht durch Ammonsulfat ausfällbar war. Die Fällung beginnt mit 1–8% Sättigung und endet bei 16–22%. Oswald<sup>5)</sup> fand in der „Albuminfraktion“ des Wasserextraktes menschlicher Nieren ein „Albumin“ mit 0,19% Phosphor.

<sup>1)</sup> K. v. Noorden, Die Bleichsucht. Wien 1897. — R. Schmidt, Zeitschr. f. klin. Med. 34. — F. Müller, Mitteil. d. Würzburger med. Klinik 1884. 266. — A. E. Taylor, Zentralbl. f. i. Med. 1897. 873. — v. Steijskal und Erben, Zeitschr. f. klin. Med. 39. — E. Salkowski, Berliner klin. Wochenschr. 44. 51. 1907.

<sup>2)</sup> A. Jolles, Zeitschr. f. klin. Med. 34. — Ber. d. deutsch. chem. Gesellschaft. 30. 172. 1897. —

<sup>3)</sup> R. Kolisch und R. Burian, Zeitschr. f. klin. Med. 29. 378. 1896. — Taylor l. c.

<sup>4)</sup> Mme. P. Eliacheff, Mém. de la Soc. de Biol. [9] 3. 71. 1881. — Obermayer l. c.

<sup>5)</sup> Matsumoto l. c. S. 401. — A. Oswald l. c. S. 244.

In der Katzenniere wies Halliburton ein Nucleoalbumin mit 0,37% P, Koagulationstemperatur 63°, nach.

B. Eigenschaften. I. Nucleoalbumine. Unter diesem Namen versteht man eine Reihe phosphorhaltiger Eiweissstoffe, deren Phosphor in komplexer Form abgeschieden werden kann. Sie unterscheiden sich von den echten Nucleoproteiden dadurch, dass sich bei der Spaltung weder Nucleinsäure, noch deren charakteristische Spaltungsprodukte (Pentose, Purin- und Pyrimidinbasen) abspalten lassen.

1. Die Nucleoalbumine sind ausgesprochene Säuren; sie röten Lackmuspapier, sind in Wasser als solche nicht löslich, sehr leicht dagegen in Form ihrer Salze mit Alkalien oder Ammoniak. Durch Säuren werden sie aus diesen Lösungen frei gemacht und gefällt. Die Lösungen ihrer Salze sind nicht koagulierbar und können daher ohne Veränderung gekocht werden. Bei so schwach saurer Reaktion, dass gerade das Nucleoalbumin noch nicht ausfällt, lässt sich dagegen bei vielen Nucleoalbuminen eine deutliche Koagulation bei bestimmter Temperatur nachweisen.

2. Die Nucleoalbumine haben grosse Ähnlichkeit mit den Globulinen bezw. deren Alkalialbuminaten. Cohnheim hat daher den Namen Phosphorglobuline für sie vorgeschlagen, um auch besonders hervorzuheben, dass sie mit den echten Nucleoproteiden keine nähere Verwandtschaft haben, da sie im Gegensatz zu diesen als Verbindungen von Eiweiss mit einem nicht näher bekannten phosphorhaltigen, eiweissartigen Komplex aufzufassen sind.

3. Bei Einwirkung von Pepsinsalzsäure wird das Nucleoalbumin zunächst gelöst und zum Teil schon in Albumosen umgewandelt. Dann wird ein phosphorhaltiger Komplex abgespalten und zunächst abgeschieden; in einem dritten Stadium wird dieser Niederschlag (Paranucleinsäure) wieder gelöst, während die Peptonisation des übrigen Nucleoalbumins fortschreitet. Orthophosphorsäure wird hierbei nicht abgespalten, wohl aber bei der Trypsinverdauung.

Typische Vertreter der Nucleoalbumine sind das Casein der Milch, das Vitellin des Eigelbs, sowie die Nucleoalbumine verschiedener Arten von Zellprotoplasma.

Aus dem Nierengewebe lässt sich ein solches Nucleoalbumin extrahieren (Halliburton, Matsumoto, Oswald), s. vorher.

4. Dem Nachweis solcher Nucleoalbumine im Harn hätte eine Darstellung in genügenden Mengen vorauszugehen. An dem dargestellten (durch Essigsäurefällung, eventuell auch durch Aussalzen) Eiweissstoffe wäre dann das Verhalten gegenüber Pepsinsalzsäure, sowie bei der Spaltung mit Salzsäure zu prüfen. Der Nachweis des P-Gehaltes allein genügt nicht, um mit Sicherheit die Natur des betreffenden Eiweissstoffes zu charakterisieren.

II Nukleoproteide. Mit diesem Namen werden Verbindungen von Nucleinsäure mit Eiweiss bezeichnet. Über die Zusammensetzung der Nucleinsäure siehe dort.

1. Die Nucleoproteide haben ausgesprochen sauren Charakter, sind in Wasser und Salzlösungen, sowie namentlich in Alkalien löslich. Durch Säuren werden sie gefällt, im Überschuss, besonders durch Mineralsäuren, wieder gelöst. Die Aussalzungsgrenzen sind bei den Nucleoproteiden verschiedener Herkunft verschieden. Durch Hitze und andere Mittel werden die Nucleoproteide, wie die nativen Eiweissstoffe, denaturiert und koaguliert. Sie geben die gewöhnlichen Farbenreaktionen der Eiweissstoffe und werden durch die gewöhnlichen Fällungsmittel gefällt. Bei Spaltungen geben sie neben den gewöhnlichen Spaltungsprodukten der Eiweissstoffe die Spaltungsprodukte der Nucleinsäure, die Nucleinbasen und vor allem Phosphorsäure.

2. Bei allen Spaltungen wird zunächst nur ein Teil des Eiweisses abgespalten, so dass eine Verbindung des Eiweissrestes mit Nucleinsäure, das sog. Nuclein, zurückbleibt. Diese Nucleine enthalten 4—7% P, sind im Magensaft schwer löslich, dagegen leicht löslich durch Trypsin.

3. Bei Einwirkung von Pepsinsalzsäure wird zunächst Eiweiss abgespalten, welches zu Albumosen und Peptonen weiter gespalten wird. Das entstehende Nuclein fällt aus. Dieser Nucleinniederschlag hat neben der Feststellung des Gehaltes an P und an Nucleinbasen zur Entdeckung der Nucleinproteide geführt. Auf diesen Eigenschaften hat auch der exakte Nachweis der Nucleoproteide im Harn zu fussen. Das Nuclein ist in guter Pepsinsalzsäure nicht ganz unlöslich. Der Niederschlag, der bei der Pepsinverdauung entsteht, kann aus Nuclein oder aber auch aus Nucleinsäure bestehen. In letzterem Falle ist also alles Eiweiss von der Nucleinsäure abgespalten. — Durch Trypsin werden die Nucleoproteide gelöst; es gehen Peptone, Aminosäuren und Nucleinsäure in Lösung.

III. Nucleohiston. Ein besonderer Vertreter der Nucleoproteide ist das Nucleohiston. Nucleohistone kommen vor in den Vogelblutkörperchen, in Leucocyten, in unreifen Testikeln verschiedener Fische. Durch Lilienfeld wurde zuerst das Nucleohiston aus Thymusleucocyten dargestellt. Durch spätere Untersucher wurde aber festgestellt, dass das Lilienfeldsche Nucleohiston aus zwei verschiedenen Nucleoproteiden besteht (Malengreau, Huiskamp, Bang)<sup>1)</sup>.

<sup>1)</sup> L. Lilienfeld, Zeitschr. f. physiol. Ch. 18. 473. 1894. — F. Malengreau, La Cellule 17. 339. 1900. — W. Huiskamp, Zeitschr. f. physiol. Ch. 32. 145. 1901; 34. 32. 1902; 39. 55. 1903. — J. Bang, Hofmeisters Beiträge 4. 115. 1903; 4. 331. 1903.



Nach H u i s k a m p soll das eine Nucleoproteid das wahre Nucleohiston im Sinne L i l i e n f e l d s sein, das andere soll kein Histon enthalten.

Das etwas anders dargestellte nucleinsäure Histon von B a n g stimmt in seinen wesentlichen Eigenschaften mit dem Nucleohiston H u i s k a m p s überein.

1. Das eigentliche Nucleohiston H u i s k a m p s hat die Zusammensetzung C 48,8, H 7,03, N 18,37, SO 51, P 3,7%. Es gibt ein Ca-Salz (mit 1,3% Ca), welches in Wasser wenig, in Chlorcalciumlösung gar nicht löslich ist. In stärkerer Salzlösung und vor allem in Ammoniak ist dieses Ca-Salz dagegen leichter löslich. Die Alkaliverbindungen des Nucleohistons sind in Wasser löslich; durch Zusatz von Essigsäure fällt aus diesen Lösungen das Nucleohiston aus. Dies ist in Wasser unlöslich. Das Nucleohiston löst sich nicht in 0,9%iger Kochsalzlösung, wohl aber in konzentrierterer. Die Fällungsgrenzen des Nucleohistons für Ammoniumsulfat sind 5,6 und 7,2, nach der durch die H o f m e i s t e r s c h e Schule eingeführten Bezeichnungsweise (s. S. 1087).

2. Die Drehung des Nucleohistons beträgt nach L i l i e n f e l d  $\alpha_D = +37,58^\circ$  (G a m g e e und J o n e s)<sup>1)</sup>.

3. Das unreine L i l i e n f e l d s c h e Nucleohiston hat in manchen Dingen abweichende Eigenschaften, die durch die Beimengungen bedingt sind. Zur Charakterisierung eines Phosphorproteids als Nucleohiston ist der Nachweis der Spaltungsprodukte, Nucleinsäure und Histon erforderlich.

4. Durch Zusatz von Kochsalz kann man eine wässrige Lösung des Nucleohistons in Alkali teilweise fällen. Man findet, dass bei einem Gehalt von 0,25% NaCl eine schwache, aber deutliche Opaleszenz eintritt, welche bei 0,5% stärker wird; nach einiger Zeit tritt schon hier ein Niederschlag ein, der bei 0,7—0,8% NaCl sich noch vermehrt; bei Zusatz von über 1,25% löst er sich wieder auf. Bei weiterer Sättigung erhält man von 15% an wieder einen Niederschlag, jedoch ist dabei gleichzeitig eine Spaltung des nucleinsäuren Histons eingetreten (B a n g). Ammoniak von 5—6%, sowie Natronlauge von 20% ab, zerlegen das nucleinsäure Histon unter Ausfällung des Histons.

Nachweis des Nucleohistons. Derselbe hat durch den Nachweis des Auftretens von Nucleinsäure und von Histon bei der Spaltung zu geschehen (s. dort).

<sup>1)</sup> A. Gamgee und W. Jones, Hofmeisters Beiträge 4. 10. 1903.



**DATE DUE SLIP**

UNIVERSITY OF CALIFORNIA MEDICAL SCHOOL LIBRARY

**THIS BOOK IS DUE ON THE LAST DATE  
STAMPED BELOW**

2m-8,'21





